MORPHOLOGISCHE UND PHYSIOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN BEI CHLORELLA FUSCA UND ANKISTRODESMUS BRAUNII UNTER EISEN- UND STICKSTOFFMANGEL

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Hartmut Spiller

aus Berlin

MORPHOLOGISCHE UND PHYSIOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN BEI CHLORELLA FUSCA UND ANKISTRODESMUS BRAUNII UNTER EISEN- UND STICKSTOFFMANGEL

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg
zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Hartmut Spiller

aus Berlin

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen der Universität Erlangen-Nürnberg.

Tag der mündlichen Prüfung:	29.1.1975
Vorsitzender der kommissarischen Promotionskommission	Prof. Dr. H. Behrens
Erstberichterstatter:	Prof. Dr. E. Kessler
Zweitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Haupt

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSÜBERSICHT

		Seite
I.	Einleitung	4
II.	Material und Methoden	7
	1. Versuchsobjekt, Anzuchtbedingungen	7
	2. Zellaufschluß und Bestimmungsmethoden	8
	3. Proteinanreicherung und Enzymtests	11
III.	Ergebnisse	15
	1. Eisenmangel	15
	1.1 Eisenmangel bei Chlorella fusca	15
	1.1.1 Wachstumskurven und morphologische Erscheinungen	15
	1.1.2 Absorptionsspektrum und Chlorophyllgehalt	17
	1.1.3 Isolierung von Flavodoxin	19
	1.1.4 Kristallisation von Flavodoxin	20
	1.1.5 Molekulargewicht und Metallgehalt	21
	1.1.6 Redoxspektren von Flavodoxin	23
	1.1.7 Flavodoxin in der NO_3^- und NO_2^--Reduktion	25
	1.2 Eisenmangel bei Ankistrodesmus	30
	1.2.1 Wachstumskurven und morphologische Erscheinungen	30
	1.2.2 Absorptionsspektrum und Chlorophyllgehalt	31
	1.2.3 Gewinnung eines Flavoproteins	32
	2. Stickstoffmangel	33
	2.1 N-Mangel bei Ankistrodesmus braunii	34
	2.1.1 Wachstumskurven	34
	2.1.2 Absorptionsspektrum	35
	2.1.3 Sexualstadien bei N-Mangel	36
	2.1.4 Trennung der Stadien im Dichtegradienten	38
	2.1.5 Nitrifikation unter N-Mangel	39
	2.1.6 Die Lokalisation von Enzymsystemen	46

Seite

2.1.7 Die Charakterisierung der Glycolat-Oxidase 52

2.1.8 Katalase und der Nachweis von Microbodies 54

2.2 N-Mangel bei Chlorella fusca 58

2.2.1 Wachstumskurve bei N-Mangel 59

2.2.2 Das kurzzeitige Auftreten von Sexualstadien von Chlorella 59

IV. Diskussion 62

V. Zusammenfassung 70

VI. Literatur 71

Abkürzungen

DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCPIP	Dichlorphenol-indophenol
DE-52	Diäthyl-aminoäthyl-cellulose
EDTA	Äthylendiamin-tetraessigsäure
Fld	Flavodoxin
FG	Frischgewicht
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	molar
MG	Molekulargewicht
MV	Methylviologen
NNEDA	N-(1-naphthyl)äthylendiamin-dihydrochlorid
OD	Optische Dichte
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro min.

I. Einleitung

Die Limitierung des Wachstums von Pflanzen durch Mineralsalze ist ein vielschichtiges Phänomen und kann selten auf eine simple Kausalkette zurückgeführt werden. Wegen der Unmöglichkeit, komplexe physiologische Prozesse auf einige wenige Leitlinien zu reduzieren, empfiehlt es sich, einige funktionale Aspekte herauszugreifen und genau zu definieren (Pirson 1955).

Eisen und Stickstoff gehören zu den sogenannten essentiellen Elementen (Arnon und Stout, 1939). Eisenchlorose ist nur ein Sammelbegriff für eine Vielzahl von Vorgängen, die Ionenaufnahme, Proteinsynthese, Photosynthese, Eisenproteine und Zellteilung beeinflussen (Price 1968). Ein großer Teil des Eisens, ob in 'pools' oder gebunden, ist im Chloroplasten lokalisiert (Anderson et al. 1964, Whatley et al. 1951). Bei Fe-Mangel treten deutliche Änderungen in der Zusammensetzung der Photosynthesepigmente und im Absorptionsspektrum von Anacystis nidulans auf (Öquist 1971, 1973), ferner werden wichtige Vorstufen der Chlorophyllbiosynthese gestört (Marsh et al. 1963, Stephan und Machold 1969) und Chlorophyll-Proteinkomplexe abgebaut (Machold 1970).

Desgleichen wird die Aktivität der Nitritreductase durch Eisenmangel gehemmt und durch Zugabe von Eisen erhöht (Kessler 1968, Cardenas et al. 1972).

Unter Fe-Mangelbedingungen wird in Bakterien an Stelle von Ferredoxin Flavodoxin gebildet. Flavodoxin kann Ferredoxin in einer Vielzahl von Reaktionen ersetzen (Zusammenfassung bei Yoch und Valentine 1972). Anacystis bildet Phytoflavin und Chlorella fusca Flavodoxin (Zumft und Spiller 1971, Bothe 1969). Beide Proteine gehören in die Gruppe der Flavodoxine.

Nach der Isolierung von Flavodoxin aus dem Eukaryonten Chlorella und seiner Teilcharakterisierung (Spiller 1972) war von Interesse, ob dieses Flavoprotein Redoxzustände, vergleichbar denen der bakteriellen Flavodoxine, und eine Carrierfunktion in der Nitrat- oder Nitritreduktion besitzt. Die Isolierung einer Flavoproteinfraktion aus Ankistrodesmus braunii Fe-Mangelkulturen kann als Vergleich dienen.

Nach Warburg und Negelein (1920) wäre die Untersuchung der Stoffwechselreaktionen bei N-Mangelalgen eine lohnende Aufgabe. Obwohl in der Zwischenzeit gute Fortschritte erzielt worden sind (vgl. Zusammenfassung bei Oesterheld, 1970), gilt dieser Satz auch heute noch. N-Mangel hat gravierende Folgen für Photosynthese, Atmung und Zellteilung (Pirson 1955). Bei Pilzen und Bakterien tritt heterotrophe Nitrifikation auf, auch bei Ankistrodesmus wurde sie nachgewiesen (Oesterheld 1970). Die intrazelluläre Bildung von Nitrat und Nitrit wurde aber von Syrett angezweifelt (Syrett und Hipkin 1973), obwohl die Oxidation von N-Verbindungen durch Pflanzenextrakte (vgl. Cresswell und Hewitt 1960) schon lange bekannt ist.

Für die Aufklärung des Stoffwechselgeschehens in der Zelle von Eukaryonten mit distinkten Organellen ist die Lokalisation von Enzymen unumgänglich. Mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation lassen sich zuerst bestimmte Partikel durch bekannte Leitenzyme identifizieren, die Lokalisation anderer Enzyme gelingt durch sie (Tolbert 1971, Richardson 1974, Stabenau 1974, Jacobi 1974).

Die Lokalisation von Nitrat- und Nitritreductase wurde von Dalling et al. (1972) durchgeführt.

Neuerdings gelang mehreren Arbeitsgruppen auch für Algen der enzymatische und elektronenmikroskopische Nachweis von Microbodies (Codd et al. 1973, White und Brody 1973, Silverberg und

Sawa 1973). Auch für Ankistrodesmus stellt sich für die Lokalisation der Nitrat- und Nitritreductase die Frage nach der Existenz und enzymatischen Komposition von Microbodies. Neben der im Überstand von Ankistrodesmus-Homogenaten feststellbaren Aktivität von Katalase könnte die Aktivität von Enzymen der Nitrifikation auf dem Dichtegradienten lokalisiert werden und damit die Lösung der Frage ihrer Funktion gelingen.

Die Beobachtung morphologischer Erscheinungen zusammen mit der Analyse biochemischer Daten kann eventuell Aufschluß über grundlegende Prozesse in der Zellentwicklung geben.

II. Material und Methoden

1. Versuchsobjekt, Anzuchtbedingungen

Versuchsobjekt waren die Grünalgen Chlorella fusca Shihira et Krauss, Nr. 211 - 15 der Algensammlung Pringsheim (Göttingen), Ankistrodesmus braunii (Nägeli) Collins, Nr. 202-7c und vergleichsweise Chlorella vulgaris 211-11q. Die Kultivierung erfolgte nach Sterilisierung der Medien im Autoklaven in 500 ml oder 5 l Kolben, im Dauerlicht von 4000 Lux, bei 25 - 28°C. Zur Begasung wurde ein 2% CO_2 enthaltendes Luftgemisch verwendet.

Das Nährmedium ist das bei Kessler und Czygan (1970) beschriebene. Zur Kennzeichnung von Fe-Mangel dienen folgende Definitionen

$$Fe_N = 2{,}5 \cdot 10^{-5} \text{ Mol/L}$$

$$Fe_1 = Fe_{N/100} = 2{,}5 \cdot 10^{-7} \text{ Mol/L}$$

schwacher Eisenmangel

$$Fe_5 = Fe_{N/500} = 0{,}5 \cdot 10^{-7} \text{ Mol/L}$$

starker Eisenmangel

Alle für Fe-Mangel verwendeten Glasgefäße wurden mit alkalischer EDTA-Lösung gereinigt. Zur Vorkultivierung auf Agarplatten und -röhrchen kam ein Vollmedium zur Anwendung:

15 g	Agar
10 g	Glucose
8 g	Fleischextrakt
2 g	Difco-Proteose-Pepton
1 g	Hefeextrakt

Die Komponenten wurden mit Kessler-Medium auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert. Zur Untersuchung des N-Mangels dienten aus

Gründen der Reproduzierbarkeit der Befunde von Oesterheld (1970) die Definitionen:

$$N / 10 = 8 \cdot 10^{-4} \text{ M } NH_4Cl \text{ bzw. } KNO_3$$

Das resultierende Mineraldefizit wurde mit KCl ausgeglichen.

Nach Abernten der Kulturen mittels einer WKF-Durchlauf-Zentrifuge wurden die Algen nach Waschen mit aqua dest. und 0,05 M Tris/HCl pH 7.5, 0,1 M NaCl sofort aufgeschlossen oder bei - 20°C in der Tiefkühltruhe eingefroren.

Zur Aufstellung der Wuchskurven wurden den Kulturen aliquots entnommen und zur Messung der Trübung bei 750 nm auf eine Dichte von 0,5 - 0,6 verdünnt. Der Verdünnungsfaktor geht in die Berechnung der OD ein.

2. Zellaufschluß und Bestimmungsmethoden

2.1 Zellaufschluß

Für den Totalaufschluß wurden Zellpaste und Glasperlen im Verhältnis 1 : 6 gemischt, 1/5 der Menge an Aufschlußpuffer zugegeben und bei 2 - 4°C zwischen 3 und 8 min. in der Zellmühle Vibrogen der Fa. Bühler aufgeschlossen. Das Homogenat wurde in der 3 - 4fachen Menge Aufschlußpuffer resuspendiert und durch Scrynel Nylongaze filtriert. Für kleinere Mengen wurde Seesand oder Alcoa Alumine 305 verwendet. Für die Herstellung von Partikeln wurden Glasperlen von 0,15 u. 0,30 mm Ø im Verhältnis 1 : 7 gemischt und mit Algenpaste im Verhältnis 1 : 4 mit wenig Aufschlußpuffer A : 0,4 M Saccharose 0,05/K-Phosphatpuffer pH. 7.5, 2 mM EDTA, 10 m/KCl 10 mM $MgCl_2$ verdünnt. Alternativ Puffer B der an Stelle von K-Phosphat Glycylglycin 0,02 M pH 7.5 enthielt, oder Puffer C: MES-Puffer 0,05 M pH 7.0 (N-morpholino-äthylsulfonsäure) mit 0,1 % Rinderserumalbumin, 1 mM

$MgCl_2$, 20 mM NaCl. Die Algenpaste wurde zwischen 10 und 40 sec. mit kurzen Intervallen homogenisiert, bis 30 - 40 % der Zellen aufgeschlossen waren.

2.2 Dichtegradienten-Zentrifugation

Der diskontinuierliche Gradient bestand aus 5 ml Fraktionen von 2,5; 2,0; 1,7; 1,6; 1,5; 1,3; 1,1 sowie 10 ml 0,85 M Saccharose, der analytische Gradient aus 2,5 ml Fraktionen in 0,05 M-Schritten von 2,5 bis 1,0 M Saccharose. Der Auftriebgradient setzte sich zusammen aus 5 ml 2,0 M Saccharose, 10 ml Homogenat in 1,9 M Saccharose, gefolgt von weiteren Stufen wie im analytischen Gradienten. Alle Saccharoselösungen wurden in 0,05 M K-Phosphatpuffer angesetzt. Trennung von Zellstadien durch Ficoll: Dichtegradientlösungen des hochpolymeren Zuckers von Ficoll (Pharmacia) wurden in 20 ml Cellulose-Nitrat Bechern übereinandergeschichtet. Je 2,5 ml von 40, 35, 30, 25 % Ficoll, gefolgt von je 3 ml 20 % und 10 % Ficoll in 0,05 M K-Phosphatpuffer pH 7.5. Nach Auftragen von 1 ml Zellmaterial wurde in der analytischen Zentrifuge (Beckman) mit Ausschwingbechern je 4 min. bei 1000 Upm und 2000 Upm zentrifugiert.

Differentielle Zentrifugation:
Zuerst Waschen der ganzen Zellen in Aufschlußpuffer, dann Zentrifugation 500 x g 5 min.. Nach Homogenisation erfolgt Auswaschen des Homogenats mit 12 ml Aufschlußpuffer pro 3 g Frischgewicht, danach Zentrifugation bei 500 x g 10 min.. Die obere Hälfte des Homogenats wird auf den Gradienten aufgetragen. Zur Gewinnung des 7000 x g Sediments wird erneut 20 min. bei 7000 x g zentrifugiert und der Niederschlag in 2 - 3 ml Aufschlußpuffer resuspendiert.

2.3 Analytische Methoden

Chlorophyll wurde in 80 % Aceton nach Arnon (1948) oder in 96 % Methanol nach Böger (1964) bestimmt. Intakte Algen wurden jedoch vor Methanolextraktion eingefroren und wieder aufgetaut. Das Gesamtchlorophyll errechnet sich nach McKinney (1941)

$$C\ (mg) = 2{,}55 \cdot 10^{-2} \cdot E_{650} + 0{,}4 \cdot 10^{-2} \cdot E_{665};$$

Nitrit wurde colorimetrisch nach Snell und Snell (1949) bestimmt, NO_3^- enzymatisch mit hochaktiver Nitratreductase von Ankistrodesmus nach Umwandlung in NO_2^-. Bei Reaktionen mit Partikelfraktionen oder Überständen wurde nach dem enzymatischen Test eine Fällung mit 0,3 n Zn SO_4 bzw. Zn-acetat vorgenommen und NO_2^- anschließend bestimmt. Zur Kontrolle des NO_2^--Gehalts wurde ferner die Methode von Scholl et al. (1974) angewandt. NO_2^- wird mit Sulfanilamid diazotiert und reagiert anschließend mit N (1-naphtyl) ethylendiamindihydrochlorid (NNDA). Bei Nitritbestimmung in Zellextrakten besteht ferner die Gefahr der Adsorption des Indikator-Komplexes an kolloide Partikel. In diesen Fällen wird unmittelbar nach Zugabe der obengenannten NO_2^--Reagenzien 0,5 ml 30% TCA hinzugegeben und nach 5 - 10 min. abzentrifugiert. Der Farbkomplex bleibt im Überstand. NH_4^+ wurde nach Zugabe von Neßlers Reagenz, nach 20 min. dauernder Farbstoffbildung, spektralphotometrisch bei 440 nm, Hydroxylamin nach Frear und Burrell (1955) colorimetrisch mit 8-OH-quinolin bestimmt. Die Proteinbestimmung wurde wie folgt modifiziert: Nach Fällung in 5 % TCA und Pigmentextraktion durch 80 % Äthanol bei 60°C wurden die Proben in 3 % NaOH hydrolysiert und aliquots für die Proteinbestimmung mit der Microbiuret-Methode oder nach Lowry entnommen (siehe Leggett Bailey, 1967). Diese Methode schließt die Störungen durch Saccharose und unspezifische Niederschlagsbildung aus.

Die Ermittlung der Zuckerkonzentration wurde mit einem Abbé Refraktometer und anschließender Dichtebestimmung an Hand einer

Eichkurve nach Tolbert (1971) vorgenommen.

Der Metallgehalt (Zn, Cu, Fe) von Überständen und angereicherten Proteinen wurde mit einem Atomabsorptionsgerät Modell 440 von Beckman ermittelt.
Analytische Polyacrylamid-Elektrophoresen wurden mit einem Kammersatz der Fa. Shandon durchgeführt. Flavodoxin wurde in einem 7,5 % Gel im System 6 nach Maurer (1968) mit Diäthylbarbitursäure als Puffer bei pH 6 und 7 analysiert. Die Spannung wurde bei 10 V/cm konstant gehalten.

Anaerobe Photoreduktion geschah nach Mayhew und Massey (1969) in Thunberg-Küvetten im Wasserbad. Als Anregungslicht diente Weißlicht von 30.000 Lux aus einem Leitz-Projektor. Spektralphotometrische Messungen wurden mit einem Zeiss PM QII oder Beckman DB-Gt Gerät durchgeführt.
Für mikroskopische Aufnahmen diente ein Forschungsmikroskop der Fa. Leitz. Elektronenmikroskopische Arbeiten wurden nach Codd et al. (1973) durchgeführt. Algen und Microbodyfraktionen wurden jedoch nach Glutaraldehyd-Fixierung in 3 % Agar eingebettet. Die Aufnahmen wurden mit einem EM-Zeiss 9 S-Gerät 60 KV gemacht. Dichtegradienten-Zentrifugation wurde im Typ G 50 K der Fa. Weinkauf vorgenommen.

3. Proteinanreicherung und Enzymtests

Ferredoxin aus Spinat wurde nach Böger (1969) hergestellt, aber ohne Protaminsulfatfällungen, Nitritreduktase nach Zumft (1970). Nitratreduktase mit hoher spezifischer Aktivität wurde nach Ahmed und Spiller (1974), Flavodoxin aus Chlorella nach Spiller (1972) präpariert. Für die photosynthetische NADP-Reduktion zur Koppelung von Ferredoxin und Flavodoxin wurden Chloroplastenbruchstücke nach Whatley und Arnon (1963) aus Spinat gewonnen; der Test wurde nach San Pietro (1963) durchgeführt.

Nitratreductase

Der Standardtest wurde nach Vennesland (1971) durchgeführt. Ein Gesamtvolumen von 2 ml enthielt 20 µ Mole KNO_3 100 µ Mole Tris/HCl Puffer pH 7.5, 0,3 µ Mole NADH und ausreichend Enzym. Nach 20 min. Beendigung der Reaktion durch Zugabe von 0,2 ml $ZnSo_4$ bzw. Zn-acetat (0,3 n), Zentrifugation des Niederschlags nach 5 min. und Zugabe von je 0,5 ml der NO_2^- - Reagenzien. Messung der OD_{540} nach 10 min. und Bestimmung der NO_2^--Menge an Hand einer Eichkurve.
Eine Einheit wird als jene Enzymmenge definiert, die in 10 min. unter Standardbedingungen (30°C) 1 µ Mol NO_3^- zu NO_2^- reduziert.

Nitritreductase

Der Standardtest wurde mit Abweichungen nach Zumft (1970) durchgeführt. Die Enzymreaktion lief bei 30°C 10 min. lang ab. Das Gemisch enthielt in einem Volumen von 2 ml 200µ Mole K-Phosphat pH 7.5, 400 n Mole (Dichtegradient) bzw. 4 µ Mole (Normaltest) KNO_2^-, 2 µ Mole MV, 7,5 mg $Na_2S_2O_2$ in 0,3 ml 0.3 M $NaHCO_3$ Lösung. Beendet wurde die Reaktion durch Aufoxidation des Dithionit und Zugabe von 0,2 ml 0,3 n $ZnSO_4$. Ein aliquot von 0,2 ml nach Zentrifugation diente zur normalen Nitritbestimmung.
Eine Einheit der Nitritreductase wird als jene Enzymmenge definiert, die in 1 min. 1µ Mol NO_2^- reduziert.

Glycolat-Dehydrogenase

Der Standardtest folgt den Angaben von Stabenau (1974). Die Reduktion von DCPIP unter anaeroben Bedingungen mit Na-Glycolat wurde in Thunberg-Küvetten bei 600 nm gemessen.
Der Ansatz besteht aus K-Phosphat 0,1 M pH 8; DCPIP 100µ M, Na-Glycolat, 7,5 mM.

Lactat-Dehydrogenase

Die Oxidation von Lactat wurde spektralphotometrisch als Reduktion von NAD^+ bei 340 nm verfolgt (nach Gawehn und Bergmeyer 1970). Der Testansatz enthielt Glycin 453 mM, Hydraziniumsulfat 362 mM, eingestellt mit NaOH auf pH 9; NAD^+ 2,4 mM; und 20 µg D- bzw. L-LDH pro Ansatz. Die colorimetrische Lactatbestimmung erfolgte nach Kumar (1974).

Katalase

Die Zersetzung von H_2O_2 kann bei 240 nm photometrisch verfolgt werden (Lück 1965). Der Gesamtansatz von 3 ml enthielt 0,05 M K-Phosphatpuffer pH 7 und soviel H_2O_2, um eine OD_{240} von 0,25 - 0,3 zu gewährleisten. Die Vergleichsküvette enthält kein Substrat, dafür aber ebenfalls Enzym, das als letzte Komponente zugegeben wird. Die Extinktionsabnahme wird 5 - 10 min. lang verfolgt. Eine Einheit wird als diejenige Enzymmenge definiert, die eine Extinktionsabnahme von 0,010 in 10 min. verursacht.

Colorimetrische Bestimmung der Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB):
Die Oxidation einer 10^{-4} M Lösung von DAB in 0,1 % Gelatine kann spektralphotometrisch verfolgt werden. (Fahimi und Herzog, 1973). Die vollständig oxidierte Lösung hat bei 1 cm Lichtweg eine OD_{450} = 0,563. Der Testansatz enthält in 3 ml 0,4 mM DAB in 0,1 % Gelatine, 0,05 M 2-amino-2-methyl-1,3-propandiol-Puffer pH 9. Die Reaktion wird in Gang gesetzt durch Zugabe von 50 µl 0,01 M H_2O_2. Die Vergleichsküvette enthält alle Komponenten, einschließlich Enzym, mit Ausnahme von H_2O_2.
Eine Enzymeinheit ist die Menge, welche eine ΔOD_{450} von 0,010/h hervorbringt.

Cytochrom c Oxidase

Die Oxidation von Dithionit - reduziertem Cytochrom c wurde bei 550 nm gemessen (Schnarrenberger et al. 1971). Der Testansatz enthielt K-Phosphatpuffer 0,08 M pH 7, Cyt c 15 µM, Dithionit 0,2 mg. Die Vergleichsküvette enthielt weder Cytochrom noch Reduktionsmittel.

NH_2OH - Oxidase

Der Verbrauch von NH_2OH wurde in Anlehnung an Cresswell und Hewitt (1960) bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt in 4 ml: NH_2OH 0,25 mM, Pyrophosphat-Puffer pH 8 0,037 M, p-Cresol 10^{-4} M, H_2O_2 3.10^{-4} M. Inkubation 15 min. bei 30°C. Mit einem aliquot wurde die Hydroxylamin-Bestimmung nach Frear und Burrell durchgeführt (siehe Abschnitt 2). Eine Kontrolle mit gekochtem Enzym sowie ein Standard ohne Enzym wurden stets mitgeführt. Gemessen wird die OD_{695} gegen den Reagenzienleerwert ohne NH_2OH.
Eine Einheit ist die Enzymmenge, welche 1 µMol NH_2OH in 15 min. umsetzt.

Chemikalien

NAD, NADP, NADH, FMN, FAD, Cytochrom c, Protaminsulfat, p-Cresol, Methylviologen, die Molekulargewichts-Standards, sowie die Chemikalien der Elektrophorese wurden von der Fa. Serva (Heidelberg) bezogen. Die Reagenzien für die Elektronenmikroskopie, DAB, Aminotriazol, 2-amino-2-methyl-1-3 propandiol kamen von Fluka (Buchs, Schweiz), DEAE-52 Cellulose von Whatman (London), Alumina von Alcoa (Pittsburgh, USA), D/L-LDH und D-, L-Lactat von Boehringer (Mannheim), Sephadex von Pharmacia (Uppsala). Andere Präparate waren nach Möglichkeit pA Ware von Merck (Darmstadt).

III. Ergebnisse

1. Eisenmangel

Schon seit mehr als 100 Jahren (Gris 1844) wird versucht, Wirkungen und Ursachen von Fe-Mangel zu erforschen. Da, wie man heute weiß, eine große Zahl organischer Verbindungen Eisen gebunden enthält, ist die Reaktion des pflanzlichen Organismus auf Entzug dieses essentiellen Minerals durchaus vielschichtig. Einigkeit besteht heutzutage in den Auffassungen, daß Eisen beim Aufbau des Photosyntheseapparates, bei der Atmung und in nicht geklärter Weise bei der Zellteilung eine Rolle spielt und daß es variable 'pools' für Eisen gibt, die eine Umverteilung ermöglichen (Review Price 1968). Physiologische Parameter von Eisenmangel bei Ankistrodesmus stammen von Pirson et al. (1952), weitere Daten über den Einfluß von Eisen auf den Zellzyklus von Chlorella von Soeder et al. (1967). Im Folgenden werden daher nur solche Befunde aufgeführt, die wesentlich erscheinen oder neues Tatsachenmaterial darstellen. Dazu gehören sowohl morphologische Beobachtungen, wie auch biochemische Daten.

1.1 Eisenmangel bei Chlorella fusca

1.1.1 Wachstumskurven und morphologische Erscheinungen

Die Limitierung des Wachstums durch Eisen wurde bereits nachgewiesen (Spiller 1972). Danach zeigt die Wachstumskurve bei Fe/100 und Fe/500 vor Erreichen der relativen stationären Phase Zweiphasigkeit. Die stationäre Phase ist relativ in Bezug auf die am Ende erreichte maximale Optische Dichte. Der Übergang in die 2. Logphase mit verminderter Wuchsrate wird nach 6 bis 7 Tagen erreicht. Das verstärkte, im Grenzfall alleinige Auftreten von Flavodoxin, das Ferredoxin in wichtigen physiologischen Reaktionen ersetzen kann, korreliert mit schwachem bis starkem Fe-Mangel.

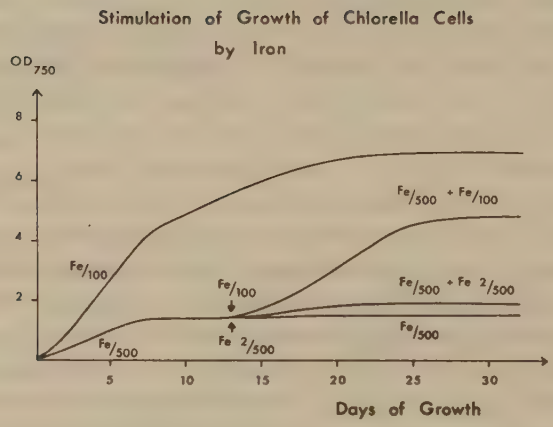


Abb. 1: Stimulierung des Wachstums von Chlorella fusca durch geringe Mengen von Eisen.

Neben der bekannten 2-Phasigkeit bei Fe/100 zeigt die Abb. 1, daß jede auch geringfügige Änderung, wie sie ein Zusatz von Fe/500 darstellt, mit erneutem Wachstum beantwortet wird, die Zellen also keineswegs irreversibel geschädigt sind. Das Wachstum geht aber andererseits nur wieder bis zum Erreichen eines neuen Niveaus weiter. Die zweite Wuchsphase kann mit der Umverteilung des ursprünglich in optimaler Konzentration vorliegenden Eisens erklärt werden (Price 1968) und mit dem Umbau des Chloroplasten, dessen Abhängigkeit vom Eisenangebot erwiesen ist.

Dazu gehört wahrscheinlich auch die Neusynthese von Proteinen.

Mikroskopisch beobachtet man neben der Ausbleichung das Überwiegen von sehr kleinen Zellen. Entnimmt man auch Proben aus dem zweiten Teil der Logphase, so findet man vereinzelt, in länger gewachsenen Kulturen häufiger, abnorme Zellstadien, (Tafel I) Stadien aus Doppelzellen, die man als stehengebliebene Teilungsstadien bezeichnen könnte und Zellen, die eindeutig von der runden Form abweichen, z.B. bohnenförmig sind. Man findet auch solche Stadien, wie sie bei Chlorella vulgaris als einmaliges Phänomen beschrieben wurden (Nat. Rdschau W. 1950). Schließlich sind, wenn auch selten, Stadien mit übereinander gekreuzten Schläuchen anzutreffen. Da bei Chlorella vegetative Vermehrung durch Autosporenbildung und nicht durch Zweiteilung vor sich geht und man bei längerem Mikroskopieren alle Übergänge bis zur Zygoten-Bildung beobachten kann, liegt es nahe, diese Befunde mit dem Auftreten von Sexualstadien bei Eisenmangel zu interpretieren. Die Parallelität dieser Formen mit denen, die bei N-Mangel auftreten, wird am Ende dieser Arbeit gezeigt. Kulturen von Chlorella vulgaris 211-11q zeigten bei längerer Kultivierung in Fe-Mangel ähnliche Kopulationsstadien.

1.1.2 Absorptionsspektrum und Chlorophyllgehalt

Chlorophyllschwund bei Fe-Mangel müßte sich auch im Absorptionsspektrum zeigen. Vergleicht man die Spektren von Fe-Mangel- mit Normalkulturen, so stellt man bei gleicher OD_{750} bei länger als 2 Wochen gewachsenen Kulturen von Chlorella fusca kontinuierliche Änderungen von Fe_N über Fe/100 bis Fe_0 fest. Abnahme der Absorption zwischen 670 und 700 nm zeigt den Abbau des Photosyntheseapparates an. Gleichzeitig ist ein Anwachsen der Absorption im Bereich 370 bis 410 nm und besonders zwischen 500 und 600 nm zu beobachten. Daß bei Fe/100 immer noch etwa die Hälfte

an Zellmaterial entsteht im Vergleich zu Normalkulturen, sich mit dem Umbau auch der photosynthetisch aktiven Kompo ten erklären. Das Semiquinon von Flavodoxin z.B. absorbiert Bereich zwischen 500 und 600 nm.

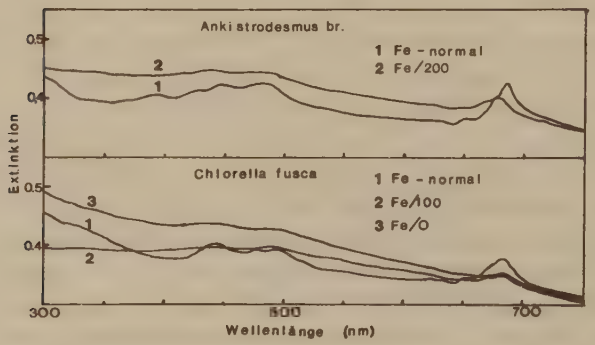


Abb. 2: Absorptionsspektren von 20 Tage alten Kulturen von Chlorella fusca und Ankistrodesmus braunii unter abgestuftem Fe-Mangel.

Ebenso zeigt der Vergleich von Chlorophyllgehalt und pH-Wert des Nährmediums mit zunehmendem Fe-Mangel abnehmende Tendenz bei beiden Algenarten. Während der erste Befund nicht überrascht, zeigt die pH-Abnahme an, daß eine Ansäuerung des Nährmediums bei Fe-Mangel trotz vorzeitigem Erreichen der stationären Phase eingetreten ist. Solange direkte Hinweise fehlen, kann man diese Beobachtung als letztliche Folge der tiefgreifenden Stoffwechseländerungen bei Fe-Mangel erklären.

Tabelle 1

Chlorophyllgehalt und pH-Wert des Mediums von 20 Tage alten Kulturen von Chlorella fusca und Ankistrodesmus braunii

	Chlorella				Ankistrodesmus			
	Fe_N	Fe_1	Fe_2	Fe_o	Fe_N	Fe_1	Fe_2	Fe_o
pH	6,5	6,35	6,2	6,05	6,5	6,35	6,1	6.15
Chloro-phyll	1,2	1,12	0,98	0,31	4,7	3	1,62	2,1

Fe_N = Fe/normal; Fe_1 = Fe/100; Fe_2 = Fe/200; Fe_0 = -Fe;
Chlorophyll in mg/g Frischgewicht.

1.1.3 Isolierung von Flavodoxin aus Chlorella fusca

Eisenmangel in Chlorella fusca ist nicht gleichbedeutend mit Chlorose. Selbst bei 1/100 der Normalkonzentration an Eisen im Kessler-Medium zeigen autotrophe Kulturen immer noch gutes Zellwachstum, das bei entsprechender Komolementierung des obengenannten Nährmediums, z.B. mit der 5 - 10fachen Menge an Zink nur auf die Hälfte der Normalproduktion herabsinkt.

Fe-Mangel führt unter anderem zur verstärkten Produktion von Flavodoxin, das an die Stelle von Ferredoxin in der photosynthetischen NADP-Reduktion treten kann. Die Isolierung und Charakterisierung einiger Eigenschaften wurde bereits beschrieben (Seiler 1972). Die wesentlichen Schritte der Isolierung zur Homogenität sollen hier noch einmal zusammengefaßt werden.

Aus dem 100.000 x g Überstand des Zellhomogenats wird Flavodoxin an einer 2,5 x 8 cm Säule von Anionenaustauscher, äquilibriert

mit 0,05 M Tris/HCl pH 7.5 adsorbiert und vom Austauscher (DE-52) mit 0,8 M NaCl 0,01 M Tris/Hcl pH 7,5 eluiert. Dieses Eluat wird einer fraktionierten Protaminsulfatfällung und Extraktion unterworfen. Zu 50 ml Überstand wird in Schritten 3 x je 2 ml einer auf pH 6.5 eingestellten, 2 % Protaminsulfatlösung gegeben und jedesmal 5 min. bei 15.000 x g zentrifugiert. Das Zentrifugat des letzten Schrittes wird 4 h gegen 0,8 M NaCl, 0,01 M Tris/Cl pH 7,5, dann 3 h gegen $5 \cdot 10^{-3}$ M K-Phosphatpuffer pH 7 dialysiert. Die folgende Fällung des Dialysats mit 2 ml der gleichen 2 % Protaminsulfatlösung führt zur vollständigen Fällung des Flavodoxins. Der orangefarbene Niederschlag wird nach Abzentrifugation mit wenigen ml einer 0,6 M NaCl-Lösung, 0,01 M Tris/HCl pH 7.5 längere Zeit mit einem Glasstab digeriert und damit das Protein wieder in Lösung gebracht. Nach erneuter Zentrifugation wird ein geringes Volumen auf eine 2,5 x 100 cm Säule von Sephadex G-75, äquilibriert mit letzterem Puffer, aufgetragen und eluiert.

Die Flavodoxinfraktionen werden nach Dialyse auf eine 1,5 x 30 cm DE-52 Säule aufgetragen und mit einem linearen NaCl Gradienten 0,15 - 0,4 M chromatographiert. Für die endgültige Reinigung kann eine weitere Sephadex G-75 Gelfiltration angeschlossen werden. Analytische Diskelektrophorese im Gelsystem 6 (nach Maurer, 1968) mit einem 7,5 % Gel im Diäthylbarbitursäure-Puffer zeigt eine Bande.

1.1.4 Kristallisation von Flavodoxin

Die wie oben beschrieben gereinigten Fraktionen werden über eine 1 x 1 cm DE-52 Säule konzentriert und mit 1,5 ml einer 0,4 M NaCl Lösung eluiert. Bei Raumtemperatur wird dann in kleinen Portionen festes Ammoniumsulfat zugegeben, bis eine Sättigungskonzentration von etwa 65 % erreicht ist. Die Probe kann

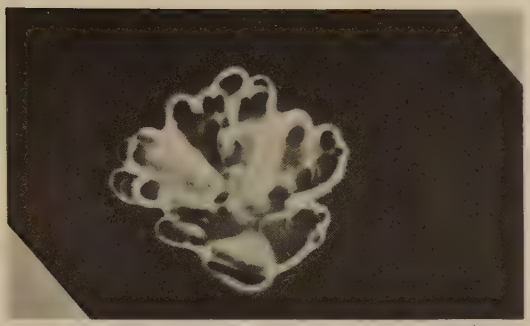


Abb. 3: Kristalle von homogenem Chlorella fusca Flavodoxin

danach offen in einen Exsiccator gestellt werden, der im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt wird. Je nach Vorbehandlung kann nach mehreren Stunden bis wenigen Tagen Nadelkristallbildung beobachtet werden.

1.1.5 Molekulargewichtsbestimmung und Metallgehalt von Flavodoxin

Die Bestimmung des Molekulargewichts von Chlorella fusca Flavodoxin mittels der Gelfiltration mit Sephadex G-75 ergab 21.100 ± 500 (Spiller 1972). Gelfiltration erzielt aber nach Andrews (1964), abhängig von der Eigenladung des Proteins, nicht immer exakte Werte. Daher wurden zusätzlich auch Probeläufe durchgeführt, ohne das Gel mit 0,1 M KCl zu äquilibrieren. Das Ergebnis zeigt Abb. 4 mit einem Molekulargewicht von 40.400. Die Erklärung für diesen unerwartet hohen Wert kann einmal die hohe negative Eigenladung des Elektronencarriers sein, die zur Abstoßung von den wenigen schwach negativ geladenen Gruppen der Gelmatrix führt, oder aber das Auftreten eines Flavodoxin-Dimeren bei geringer Ionenstärke.

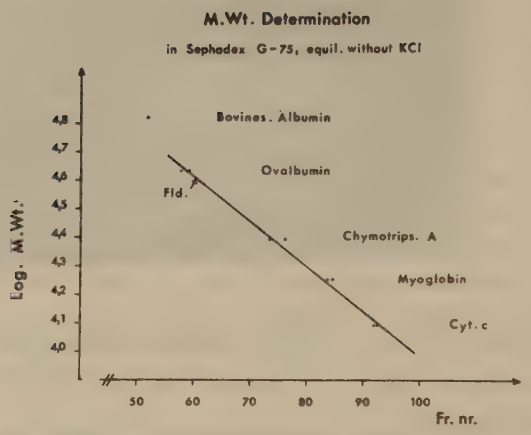


Abb. 4: Molekulargewichtsbestimmung von Chlorella fusca Flavodoxin in 0,01 M Tris/HCl Puffer pH 7.5

Untersuchungen zwecks Klärung des Vorkommens von Untereinheiten verliefen negativ.

Homogenes Flavodoxin wurde u.a. auf den Metallgehalt hin überprüft. Von den in Frage kommenden Metallen wurden Cu, Fe, Zn untersucht. In allen Fällen war keine Assoziation eines der Metalle mit dem Protein nach Gelfiltration in meßbaren oder sogar stöchiometrischen Mengen festzustellen.

1.1.6 Redoxspektren von Flavodoxin

Flavodoxine besitzen als niedermolekulare Flavoproteine die bemerkenswerte Eigenschaft, in drei Redoxzuständen aufzutreten und sind auch wegen ihrer relativ niedrig liegenden Redoxpotentiale vorzügliche 1- oder 2-Elektronenüberträger (Massey und Ghisla, 1974).

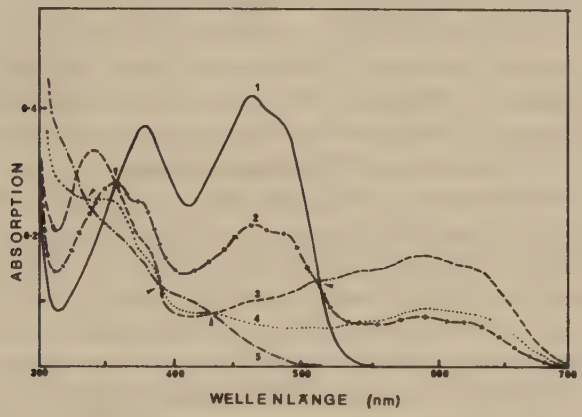
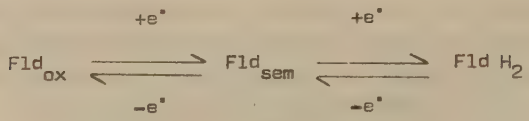


Abb. 5: Anaerobe Reduktion von Chlorella fusca Flavodoxin mit $Na_2S_2O_4$. Protein in 0,025 M $Na_4P_2O_7$, 0,03 M EDTA pH 8.7. Dithionit gelöst im gleichen Puffer, zu 4 mg/ml, Zugabe in 20 µl Schritten mit anschließender langsamer Reoxidation. Spektren 1 - 5 Übergang von Fld_{ox} - Sem. qu. (3) - $Fld.H_2$ (5). Korrigiert auf Grund der Verdünnung durch Reduktionsmittel.
► isosbestischer Punkt; Fld. 4,1 · 10^{-5} M.

Man unterscheidet oxidiertes Flavodoxin, Flavosemiquinon und reduziertes Flavohydroquinon.



Wie schon mehrfach gezeigt werden konnte, läßt sich Flavodoxin unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von EDTA unter Lichteinwirkung reduzieren.(Massey und Ghisla, 1974) (Spiller, 1972). Auch eine rein chemische Titration liegt im Bereich des Möglichen (Mayhew, 1971). Nur stößt die Aufklärung der Elektronenübergänge wegen der O_2-Empfindlichkeit der reduzierten Stufen auf erhebliche experimentelle Schwierigkeiten. Fld_{ox} ist ein guter Elektronenakzeptor, Fld H_2 dagegen ein sehr guter Donor. Unter strikt anaeroben Bedingungen tritt bei Zugabe von wenig Reduktionsmittel zunächst immer etwas Fld H_2 auf, das in einer langsamer verlaufenden Reaktion mit dem restlichen Fld_{ox} zum Semiquinon symproportioniert. Das zeigt sich daran, daß die entstehenden Übergangsspektren nicht mehr durch die isosbestischen Punkte verlaufen. Zum Studium der Übergänge müßten kinetische Betrachtungen kommen. Da ferner die exakte Natur der $S_2O_4^{2-}$-Derivate, die in vitro Elektronen übertragen, noch nicht restlos geklärt ist, bleibt die Aufklärung der Reduktionsstufen ein Problem. Die hier dargestellten Übergänge wurden durch langsame, vorsichtige Reoxidation des zunächst einmal reduzierten Fld H_2 mit O_2 gewonnen. Unter den obengenannten Bedingungen läßt sich Flavodoxin mit EDTA im Licht nur bis zum Gleichgewicht Fld_{ox}/Fld_{sem} reduzieren.

Tabelle 2

EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN UND ISOSBESTISCHE PUNKTE VON *CHLORELLA FUSCA* FLAVODOXIN

(nm)	Extinkt.-Koeffizient			Isosbestische Punkte (nm)	
	Oxid.	Semiqu.	Red.	Ox/Semiqu.	Semiqu./Red.
275	52.900	-	-	325	330
352	-	7.800	-	362	386
379	8.670	4.600	-	516	426
464	10.000	2.600	700		
588	-	4.300	-		

Ext.-Koeffiz. ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

1.1.7 Flavodoxin als Elektronencarrier in der Nitrat- und Nitritreduktion

Obwohl Flavodoxin in einer Reihe von Reaktionen Ferredoxin ersetzen kann, konnte bisher die Frage nicht geklärt werden, ob eine der reduzierten Formen des Flavodoxin als Donor für die Nitratreductase fungieren kann. Smillie beantwortet diese Frage positiv (Smillie et al. 1971) für die sogenannte Photoreduktion von NO_3^- mittels Phytoflavin, ohne allerdings experimentelle Daten anzuführen.

Tab. 3 vergleicht die Wirksamkeit verschiedener Komponenten in dem Standardtest für die Nitratreduktion mit hochgereinigter Nitratreduktase aus *Ankistrodesmus braunii*.

Tabelle 3

VERGLEICH VERSCHIEDENER COFAKTOREN IN DER REDUKTION VON NITRAT DURCH ANKISTRODESMUS NITRATREDUKTASE

Zusätze zum Standardtest	NO_2^- gebildet (nMole)
- Cofaktor - Enzym	-
- Cofaktor - Enzym + $S_2O_4^{2-}$	-
+ NADH - Enzym	-
+ Fld + $S_2O_4^{2-}$	-
- NADH + Enzym + $S_2O_4^{2-}$	42
+ NADH + Enzym	112
+ Fld (6nMole) + Enzym + $S_2O_4^{2-}$	37
+ Fld (12nMole) + Enzym + $S_2O_4^{2-}$	52
+ Fld (6nMole) + Enzym + $S_2O_4^{2-}$ (anaerob)	55

Experimentelle Bedingungen wie im Standardtest, Nitratreductase 0,1 mg, $Na_2S_2O_4$ 0,8 mg in 0,05 M K-Phosphat pH 7.5. Reaktionszeit 10 min. bei 30°C. Nitratreductase stabilisiert durch 20 µM FAD.

Flavonucleotide sind wirksame Elektronenüberträger bei der Nitratreduktion (Zumft 1970). Die oben aufgeführten Umsatzraten zeigen, daß der Zusatz von Flavodoxin zum Testansatz keine Steigerung im Vergleich zur Kontrolle (+ Enzym + Dithionit) bringt. Eine signifikante Steigerung tritt jedoch auf, wenn die Menge an Flavodoxin erhöht wird oder die Reaktion anaerob durchgeführt

wird. Diese Steigerung kann einmal mit dem Auftreten von freiem FMN erklärt werden, das ebenso wie FAD Elektronen übertragen kann, andererseits durch Flavin-Flavin Kopplung, bei der besonders unter anaeroben Bedingungen Elektronen von $FldH_2$ auf freies Flavin übertragen werden, das wieder an die Nitratreductase ankoppeln kann. Eine direkte Rolle von Flavodoxin bei der Reduktion von Nitrat läßt sich aus diesen Befunden nicht ableiten.

Nitrit kann im Dunkeln wie im Licht in einem rekonstituierten System zu Ammonium reduziert werden (Paneque et al. 1964). In Gegenwart von Chloroplasten kann bei Belichtung Ferredoxin als Elektronencarrier fungieren, Phytoflavin vermag Ferredoxin in dieser Reaktion zu ersetzen (Bothe 1969). Ebenso wird Nitrit in vitro durch Nitritreductase und chemisch reduziert gehaltenes Ferredoxin umgesetzt (Zumft 1970). Die enzymatische Funktion von Flavodoxin 'in vitro', ohne photosynthetische Reaktion, konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

Tabelle 4

ENZYMATISCHE NITRITREDUKTION MIT GEREINIGTER NITRITREDUCTASE AUS *CHLORELLA FUSCA* VERMITTELT DURCH MV UND FLAVODOXIN AUS *CHLORELLA*

Puffer	pH	Elektronenüberträger (nMole Nitrit umgesetzt) MV	Fld.
K-Phosphat 0,05 M	7,5	2000	336
K-Phosphat 0,05 M	7	1900	337
Tris/HCl 0,05	8	1900	340
Tris/HCl 0,05	7,5	1900	344
Na-acetat 0,05	6	1900	320

Reaktionsbedingungen wie im Standardtest, 10 min. aerob, MV 2 μMole, Fld 5,5 nMole, NO_2^- 2 μMole. Werte abzüglich der Kontrolle (- Cofaktor + Enzym). Nitritreductase nach Zumft (1970) 0,07 mg.

Nachdem aus den vorliegenden Werten hervorgeht, daß mit Dithionit reduziertes Flavodoxin als Elektronenüberträger für Nitritreductase fungieren kann, wobei im pH Bereich von 6 bis 8 in verschiedenen Puffersystemen nur geringfügige Unterschiede auftreten, soll die Frage untersucht werden, ob der Ausschluß von Luftsauerstoff oder der Zusatz von ATP eine Steigerung des Gesamtumsatzes bewirken.

Tabelle 5

EINFLUß VON LUFTSAUERSTOFF UND ATP AUF DIE FLAVODOXIN-VERMITTELTE NITRITREDUKTION DURCH CHLORELLA NITRIT-REDUCTASE

	Fld 5nMole aerob	Fld 10nMole aerob	Fld 15nMole aerob	Fld 10nMole anaerob	Fld 10nMole ATP 50nMole anaerob	Fld 10nMole ATP 250nMole anaerob
nMole Nitrit umgesetzt	165	223	320	315	315	320

Reaktion in Thunberg-Gefäßen, Ansatz wie im Standardtest, Dauer 10 min., Enzym 0,1 mg. Werte abzüglich der Kontrolle - Cofaktor.

Aus den erhaltenen Werten läßt sich zwar keine Steigerung des Umsatzes durch ATP ableiten, jedoch führt die Erhöhung der Flavodoxinmenge bei offensichtlich noch limitierender Konzentration zu einer höheren Rate. Anaerobe Bedingungen resultieren in einer Steigerung um 30 %. Die Entstehung von NH_4^+ wurde mit Nesslers Reagenz qualitativ nachgewiesen. Eine NO_2^--Reduktion mit reduziertem Flavodoxin allein konnte nicht gefunden werden, auch nicht photochemisch mit Licht und EDTA.

1.2 Eisenmangel bei Ankistrodesmus braunii

Die Untersuchung des Fe-Mangels bei einem verwandten Organismus kann gemeinsame Grundzüge oder unterschiedliche Reaktionsweisen auf den gleichen externen Stress aufdecken.

1.2.1 Wachstumskurven und morphologische Erscheinungen

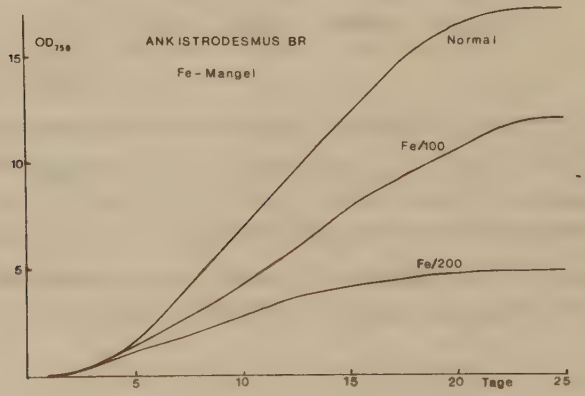


Abb. 6: Wachstumskurven von Ankistrodesmus braunii bei abgestuftem Fe-Mangel

Ähnlich wie bei Chlorella fusca, wenn auch nicht so stark ausgeprägt, zeigen die Fe-Mangelkurven Zweiphasigkeit vor Erreichen der stationären Phase. Im Unterschied zu Chlorella achsen Fe/100 Kulturen zu einer höheren Zelldichte heran und um strenge Fe-Mangelbedingungen zu erzeugen, muß die Fe-Konzentration auf 1/200 oder darunter gesenkt werden. Impft man aus normal gewachsenen Kulturen auf Fe/100 an, so beobachtet man u.U. keine Verminderung der gesamten Zellproduktion, gemessen als g Frischgewicht/Zeit. Der Bedarf an Eisen ist bei Ankistrodesmus offensichtlich geringer oder es wird vom Organismus sparsamer eingesetzt, z.B. durch Vorratshaltung in 'pools'.

Nach 7 - 10 Tagen, abhängig von der Animpfmenge und dem im Medium verfügbaren Eisen, beobachtet man leichtes Ausflocken, das in der Regel nach weiteren 5 Tagen wieder verschwindet. Der größere Teil der Zellen ist wahrscheinlich von diesem Phänomen nicht betroffen im Unterschied zu den bei N-Mangel gemachten Beobachtungen. Mikroskopisch lassen sich auch von der Norm abweichende Zellformen, mit ungewöhnlich langen Spitzen und schlauchähnlichen Ausstülpungen feststellen, neben Aggregaten, die man als Vereinigung dieser Zellformen auffassen kann (vgl. dazu Tafel I, Bild 3,4). Bei länger anhaltendem Fe-Mangel, das ist etwa nach 3 - 4 Wochen, findet man 3 verschiedene Zelltypen: kürzere abgerundete Zellen, schräg unterteilte Doppelzellen, man könnte sie als stehengebliebene Teilungsstadien bezeichnen, sowie die schon oben beschriebenen Zellen mit schlauchförmigen Ausstülpungen, die man als gametenähnlich bezeichnen könnte. Der letztere Typ ist vergleichbar mit den bei N-Mangel beschriebenen Sonderformen (Teil 2).

1.2.2 Absorptionsspektrum und Chlorophyllgehalt

Änderungen im Absorptionsspektrum bei Ankistrodesmus unter Fe-Mangel sind nicht so eklatant wie bei Chlorella. Zwar kann man

eine Verminderung der Absorption bei 680 nm und eventuell einen 'shift' des Maximums zum Kurzwelligen feststellen, analog den Beobachtungen von Öquist (1971) bei Anacystis, im übrigen unterscheidet sich aber das Spektrum wenig, abgesehen von einer allgemeinen Nivellierung, von dem Fe/O Spektrum von Chlorella (Abb. 2).

Chlorophyllgehalt und pH fallen von Fe_N bis Fe_O wie bei Chlorella mit Ausnahme der letzten Werte des Chlorophylls, die über denen von Chlorella liegen, was auch die rein optische Beobachtung bestätigt, daß Fe-Mangel-Kulturen von Ankistrodesmu äußerlich keine allzustarke Ausbleichung zeigen (Tab. 1).

1.2.3 Gewinnung eines Flavoproteins aus Ankistrodesmus mit elektronenübertragenden Eigenschaften

Die Anreicherung von stärker negativ geladenen Proteinen aus Fe/100 Kulturen von Ankistrodesmus nach dem bei Chlorella praktizierten Verfahren ergibt geringe Mengen an Ferredoxin. Bei stärkerem Fe-Mangel, also Fe/200 und Fe_O, lassen sich nach der Vorreinigung des 100.000 x g Zellhomogenats durch wiederholte DE-52 Chromatographie schließlich Fraktionen isolieren, die nach erneuter Gelfiltration an Sephadex G-75 im Test der photosynthetischen NADP-Reduktion geringe Umsätze katalysieren.

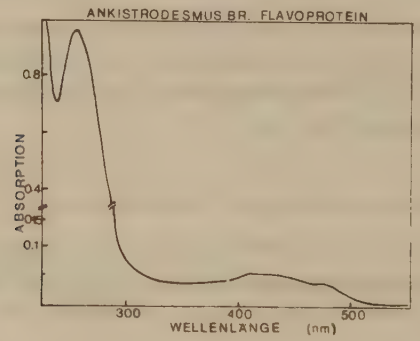


Abb. 7: Absorptionsspektrum eines aus Fe-Mangelkultur von Ankistrodesmus braunii isolierten Flavoprotein

Im Test mit Nitritreductase aus Chlorella katalysierte die Hauptfraktion die Umsetzung von 2 µMolen Nitrit/mg Protein. 10 min. unter Standardbedingungen (siehe Methoden). Die endgültige Trennung von einer Cytochromfraktion gelang bisher nicht. Es könnte allerdings sein, daß ein Proteinkomplex vorliegt, dessen Auftrennung zur Inaktivierung führt. Eine exakte Parallele zum Chlorella Flavodoxin besteht offensichtlich nicht.

2. Stickstoffmangel

Die herausragende Rolle von N-Verbindungen im Stoffwechsel der Pflanzen war Gegenstand vieler Untersuchungen. Für einen Überblick sei auf die Dissertation von Oesterheld (1970) verwiesen. In dem vorliegenden Rahmen interessieren Fragenkomplexe, die zu Kontroversen geführt haben (Syrett und Hipkin 1973) oder zur Ergänzung sowie Weiterführung der anstehenden Probleme leiten. Zunächst erfolgt die genaue Analyse des Wuchsverhaltens unter N-Mangel, begleitet von morphologischen Beobachtungen, die Analyse der Nachweismethoden und Produkte der Nitrifikation, sowie der Versuch der Lokalisierung der wichtigsten Enzymsysteme unter Normal- und N-Mangelbedingungen.

Zu Vergleichszwecken sollen ferner einige Grundzüge des N-Mangels bei Chlorella fusca 211-15 aufgezeigt werden.

2.1 N-Mangel bei Ankistrodesmus braunii

2.1.1 Wachstumskurven von Normal- und N-Mangelkulturen

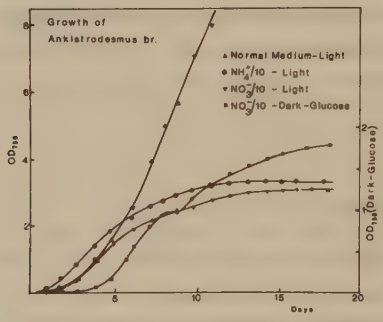


Abb. 8: Wachstumsverhalten von Ankistrodesmus braunii bei N-Mangel

Im Vergleich zum Wachstumsverlauf der Normalkultur zeigen Ammonium/10 und Nitrat/10 Kulturen Zweiphasigkeit vor Erreichen der stationären Phase: ein schneller Anstieg bis zum 5./6. Tag, danach ein Übergang mit folgender, geringerer Rate bis zum 13. Tag. NH_4^+/10 und NO_3^-/10 liegen nahezu parallel. Die Länge dieser Phasen anhaltenden Wachstums hängen natürlich von der Animpfmenge und den äußeren Bedingungen ab, in den hier genannten Beispielen 30°C unter Licht (4000 Lux). NO_3^-/10 Kulturen mit 0,5 % Glucose im Dunkeln kultiviert, zeigen zwar ebenfalls 2-Phasigkeit, wachsen aber nicht zu der Zelldichte heran, wie die im Licht gezogenen N/10 Kulturen. Außerdem zeichnet sich die Wuchskurve durch einen deutlichen Einschnitt nach dem 7. bis 8. Tag aus, mit scheinbar unter-

brochenem Wachstum. Dieser Einschnitt ist feststellbar, gleichgültig ob man als Animpfmedium von einer sterilen Platte oder einer länger gewachsenen Flüssig-Normal- oder Flüssig-N/10 Kultur ausgeht.

Die Deutung der 2-Phasigkeit liegt auf derselben Linie wie beim Fe-Mangel: nach Erschöpfung der im Medium oder in zelleigenen 'pools' vorliegenden Reserven schaltet der Organismus um auf die Erhaltung der essentiellen Prozesse, unter Abbau der wenigen N-Verbindungen, wobei das Wachstum eine begrenzte Zeit weitergeht (Oesterheld 1970).

2.1.2 Absorptionsspektrum von Normal- und N-Mangelkulturen

Der Vergleich der Absorptionsspektren von N/10-Licht und N/10-Dunkel-Glucose mit dem Spektrum der Normalkultur zeigt die deutliche Abnahme der für die Lichtabsorption im Sichtbaren verantwortlichen Pigmente, insbesondere zwischen 660 und 700 nm. In der N/10-Dunkel-Glucose Kultur ist der Abbau oder vielmehr die durch fortlaufende Teilung eingetretene Verdünnung am stärksten. Dieser Abbau der Pigmente ist aber nicht vollständig, da selbst die letztgenannte Kultur nach 3 Wochen noch grün-gelb erscheint. Insgesamt bestätigen die Spektren die Beobachtungen über verringerte Photosyntheseleistung (Pirson 1937), sowie über die Abnahme des Chlorophyllgehalts (Spoehr und Milner, 1949) bei N-Mangel.

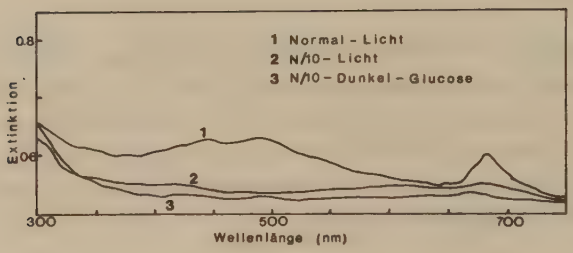


Abb. 9: Absorptionsspektren von 18 Tage alten Kulturen von Ankistrodesmus braunii

2.1.3 Sexualstadien von Ankistrodesmus braunii bei N-Mangel

Die im vorangehenden Abschnitt beschriebene 2-Phasigkeit des Wachstums zeichnet sich auch durch morphologische Besonderheiten bei N-Mangel aus. Bei autotrophen Bedingungen beobachtet man in N/10 Kulturen nach 4 - 6 Tagen, der Zeitpunkt kann sich etwas verschieben, ein Ausflocken und Sedimentieren von Algen, das durch kräftiges Schütteln nur vorübergehend aufgehoben werden kann. Diese Erscheinung dauert 1 - 2 Tage, wobei sich die ursprünglich dunkelgrüne Farbe der Kultur zusehens nach gelbgrün aufhellt. Gleichzeitig kann man mikroskopisch Stadien beobachten, die bei dieser als autosporin beschriebenen Art unter Normalbedingungen kaum zu finden sind. Es sind zum Teil

Zellen mit mehreren Spitzen, auch finger- oder schlauchförmigen Gebilden, oft recht bizarre Formen, die in Klumpen aneinanderhängen (vgl. Tafel 2, Bild 1 - 4). Am häufigsten sind Zweierpaare (Bild 1), die in fortgeschrittenerem Stadium miteinander verschmelzen, wobei die beiden Spitzen auch später noch als Relikt vom gemeinsamen Zellsack abstehen. Diese Überreste machen es auch später noch möglich, diese Gebilde als 'Zygoten' zu definieren.

Bild 3 zeigt ein beginnendes Verschmelzungsstadium nach 3 Tagen in N/10. Die gametenähnlichen Zelltypen sind durchaus nicht einheitlich, jedoch weichen sie deutlich von der normalen Spindelform ab. Bild 4 zeigt ein repräsentatives Bild nach 6 Tagen derselben N/10 Kultur. Die vereinigten Zellen haben sich bereits differenziert und stehen vor der Freigabe neuer Tochterzellen. Gerade bei N-Mangel ist aber nicht gesagt, daß diese Entwicklung zu Ende geführt wird, denn auch diese Übergangsstadien können zu Dauerformen mit fester Wand werden und ergeben bei fortgeschrittenem Alter der Kultur ein heterogenes Bild von verschiedenen Zelltypen, das den nach diesen Beobachtungen unzutreffenden Ausdruck des Polymorphismus nahelegt. Treffender wäre der Begriff Übergangsstadium (vgl. Bild 5). Nach 20 Tagen zeigen alle Zelltypen die für Fetteinlagerung charakteristische Sprenkelung.

Bei der N/10 Kultur von 'Dunkel-Glucose' wurde die Gametenkopulation nach 7 Tagen beobachtet, stimmt also mit dem Bruch in der Wachstumskurve überein. In dieser Zeit scheint die normale Zellvermehrung kurzfristig unterbrochen zu sein. Ein ähnliches Phänomen tritt, wie später gezeigt wird, auch bei Chlorella auf. Das mikroskopische Bild der Glucose N/10 Kultur zeigt Tafel 3, Bild 1 - 3: Eine Vielzahl von meist abgerundeten Formen mit vereinzelten Zweierstadien, auch hier wieder eingelagerte Fettkörper.

Das vorübergehende Auftreten von Sexualstadien ist aber nicht nur auf Eisen- oder Stickstoffmangel beschränkt. Diese Stadien konnten ebenfalls einmal bei kurzzeitigem Ausfall der CO_2-Anlage beobachtet werden. Ein massenhaftes Ausflocken mit nahezu klarem Überstand des Anzuchtkolbens wurde beobachtet. Bei Wiederanschluß von 2 % CO_2 kam es zu einer schnellen Differenzierung in der Zygote und zur Bildung von Tochterzellen (Tafel 4, Bild 1 - 3).

Diese Stadien unterscheiden sich nach Entstehung und Ausbildung deutlich von den von anderen Autoren beschriebenen (Pirson und Kellner, 1952; Kellner 1955). Sie sind im Unterschied zu jenen meist vorübergehender Natur (siehe Pirson und Kellner, 1952). Ein Vergleich mit den von Kellner (1955) beschriebenen Formen ist aber insofern möglich, als auch im vorliegenden Fall eine gewisse, morphologisch erkennbare Anpassung an Fe-Mangel erfolgt, die bei Zugabe von Eisen aber wieder gänzlich verschwindet. Bei Kellner (1955) werden dagegen sogar Mutationen diskutiert.

2.1.4 Trennung von N-Mangelstadien im Dichtegradienten

Zellen und Zellstadien unterschiedlicher Dichte von Hefe lassen sich auf einem Sorbitolgradienten trennen (Sena et al. 1973). Diese Technik wurde mit Ficoll, einem synthetischen hochmolekularen Zucker der Fa. Pharmacia, zur Anwendung gebracht, mit ausgeflocktem Zellmaterial aus N-Mangelkulturen von Ankistrodesmus. Der Vorteil von Ficoll liegt darin, daß es, obwohl osmotisch wirksam, nicht in die Zellen eindringt. 1 ml Zellmaterial wurde auf den Gradienten aufgetragen und niedertourig kurze Zeit zentrifugiert (siehe Methoden). Die Trennkapazität wird in Abb. 10 deutlich. Einzelzellen lassen sich durch eine

einzige Zentrifugation von Zweierstadien, Zellaggregaten und Zygoten so abtrennen, daß die Fraktionen 2 - 4 40% der Kopulationsstadien und nur 10 % der Einzelzellen enthalten. Eine unkomplizierte Anreicherung von Stadien liegt hier also im Bereich des Möglichen.

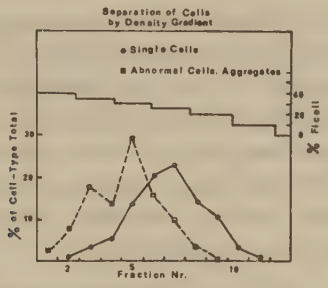


Abb. 10: Trennung von Ankistrodesmus Zellstadien im Ficoll Dichtegradienten

2.1.5 Nitrifikation unter N-Mangel

Bei N-Verarmung von Ankistrodesmus braunii wurde intracellulär Nitrat und Nitrit gefunden und als Folge von heterotropher Nitrifikation interpretiert (Oesterheld 1971). Das Auftreten dieser Ionen in N-Mangelzellen im intracellulären Raum wurde angezweifelt und war mit vorgeblich emofindlichen Methoden nicht nachzuweisen (Syrett und Hipkin 1973).

2.1.5.1 Nachweismethoden und Produkte der Nitrifikation

Der Nachweis von NO_2^- als Azofarbstoff ist sehr empfindlich mit Sulfanilamid/HCl und NNEDA sind 2 nMole sicher nachweisbar. Mit den auch von Syrett und Hipkin verwendeten Reagenzien nach Griess-Ilosvay ist der Nachweis im unteren Konzentrationsbereich um 1/3 schwächer, außerdem stören Komponenten im Überstand stärker und führen zu einer Verfärbung nach orange. Die Bestimmung von NO_2^- in Überständen ist wegen des Einflusses unbekannter Komponenten auf den Farbtest ohnehin problematisch. Proteine können entweder vor der Bestimmung mit alkalischer $ZnSO_4$-Lösung oder nach der Zugabe der Nitritreagenzien mit 5 % TCA ausgefüllt werden. Dasselbe gilt natürlich für aufgetaute Zellsuspensionen, nur ist in der oben zitierten Arbeit von diesen Schwierigkeiten nicht die Rede.

Die Bestimmung von NO_3^- im gleichen Konzentrationsbereich ist chemisch nicht möglich, gelingt aber enzymatisch bei Zugabe von hochaktiver Nitratreduktase von Ankistrodesmus, wie unten gezeigt. Der Nitritgehalt der gleichen Probe wird vorher bestimmt. Liegt im Zellextrakt oder auch Überstand Nitritreductase vor so kann die enzymatische Nitratbestimmung beeinträchtigt werden, weil nicht ausgeschlossen werden kann, daß während der Reaktionszeit von 10 min. auch NO_2^- von endogenen Faktoren umgesetzt wird. In diesem Fall ist die Nitratbestimmung nie quantitativ.

Im Folgenden werden zwei Methoden aufgeführt zur Bestimmung von Nitrit in gewaschenen Zellsuspensionen von N-Mangelkulturen von Ankistrodesmus.

Methode A (nach Syrett und Hipkin 1973)
Ganze Zellen werden in 0,1 M Tricin pH 8.5 gewaschen und eingefroren. Nach dem Wiederauftauen werden die Zellen 15 min.

auf 100°C erhitzt, abgekühlt und anschließend auf NO_2^- und NO_3^- geprüft.

	Nitritgehalt (nMole)	
0,2 ml Probe gekocht	-	
Tricinpuffer 0,2 ml + 200 nMole, NO_2^-; gekocht	200	
0,2 ml Probe + 200 nMole NO_2^-; gekocht	142	Kontrolle 1
0,2 ml Probe + 200 nMole NO_2^-; gekocht	179	Kontrolle 2

Methode B

Aufgetaute Zellen werden in 0,05 M Tricin pH 8.5, 0,1 M NaCl in der Kälte aufgeschlossen, hochtourig 20 min. abzentrifugiert und der Nitritgehalt sofort bestimmt. Unmittelbar nach Zugabe der Reagenzien Zusatz von TCA (5 % im Ansatz) und Entfernung des Niederschlags durch Zentrifugation.

0,2 ml des Überstandes: 3 nMole Nitrit

Methode A zeigt, daß nach Erhitzen der Zellsespension kein Nitrit mehr gefunden wird, die beiden Kontrollen, die bei den obengenannten Autoren nicht erwähnt wurden, zeigen aber ebenso deutlich, daß während dieser Behandlung das 6 - 15fache an Nitrit verbraucht wird, das eventuell nachgewiesen werden soll. Methode B erhebt nicht den Anspruch, den absoluten Gehalt an endogenem Nitrit zu erfassen, denn auch bei der Homogenisation werden Enzyme freigesetzt, die in der Zeit der Probenbehandlung einen Teil des Nitrits reduzieren können. Nach unserer Erfahrung reicht die Zeit der Lagerung bei 4°C über Nacht aus, um Nitrit und Nitrat aus den Überständen von Homogenaten zu entfernen.

Als nachweisbare Produkte der Nitrifikation konnten über einen Zeitraum von 4 Wochen Nitrat und Nitrit im Rahmen der oben aufgezeigten Möglichkeiten in N-Mangelkulturen nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde der Standardtest für Nitratreductase herangezogen, mit 3 Ansätzen pro Probe. Alle Proben waren aber ohne Nitrat. Probe 1 mit NADH + 20 µl aktiver Nitratreductase, Probe 2 mit NADH, Probe 3 mit NADH wurde im Eisbad aufgehoben. Allen Proben wurde 0,2 ml Extraxt zugesetzt und Proben 1 und 2 15 min. bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe der Nitritreagenzien wurden alle Proben auf 5 % an TCA gebracht und nach 10 min. abzentrifugiert. Abb. 11 zeigt den Nitrat- und Nitritgehalt von N/10 Kulturen im Verlauf von 4 Wochen. Es sind jeweils verschiedene Wuchsreihen. Die oberste Wuchsreihe gibt den Nitrat-/Nitritgehalt von gealterten Überständen wieder, die restlichen Überstände wurden sofort bestimmt.

Der Nitratgehalt geht durch ein Maximum nach etwa 2 Wochen, der Nitritgehalt zeigt eher abnehmende Tendenz, beide liegen auch in derselben Größenordnung. Im Vergleich zu den von Oesterheld (1970) angegebenen Werten ist der gefundene Nitratgehalt kleiner, der von Nitrit dagegen größer. Das können aber durchaus Unterschiede auf Grund der Methodik sein. Die oberste Reihe zeigt drastisch, daß bei Bestimmung der

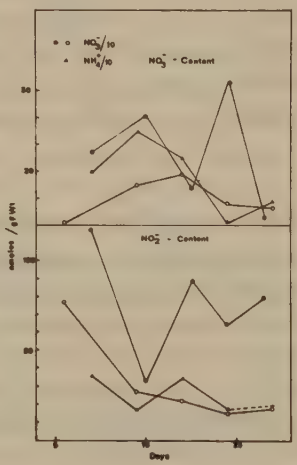


Abb. 11: Nitrat- und Nitritgehalt von N/10 Kulturen von Ankistrodesmus

beiden Ionen in gealterten Überständen nach 20, bzw. 16 Tagen Minima auftreten, an Stellen wo die jeweiligen Enzymaktivitäten Maxima besitzen.

2.1.5.2 Die Oxidation von Hydroxylamin

Die Ergebnisse von Oesterheld bezüglich der Aktivität von Nitratreductase und Nitritreductase in Abhängigkeit vom Kulturalter bei N/10 können im wesentlichen bestätigt werden. Unklar bleibt jedoch, aus welchen Ausgangsprodukten NO_2^- gebildet wird. Bei Aspergillus flavus wurde die enzymatische Oxidation von NH_2OH zu Nitrit und Nitrat nachgewiesen (Molina und Alexander 1972). Untersuchungen bei Ankistrodesmus ergeben, daß Nitrat und Nitrit von N/10 Kulturen unter autotrophen und heterotrophen Bedingungen (Licht, Dunkel, Dunkel + Glucose) gebildet werden kann. Zunächst soll die chemische Reaktion von NH_2OH mit H_2O_2 untersucht werden.

Tabelle 6

CHEMISCHE BILDUNG VON NITRIT AUS NH_2OH UND EDTA MIT O_2^{2-}

Komponenten	Nitrit (nMole/15 min.)
EDTA + K-Ph.	-
EDTA + O_2^{2-}	-
NH_2OH + K-Ph. + O_2^{2-}	-
NH_2OH + K-Ph. + EDTA	3
NH_2OH + K-Ph. + EDTA + O_2^{2-}	30

(M): Na-EDTA 0,2 mM; K-Phosphat 0,05 M; NH_2OH 0,5 mM;
H_2O_2 0,015 M;
Reaktion 15 min. bei 30°C, pH 7.5

Wie die obigen Daten zeigen, kann Nitrit aus freiem NH_2OH bei Gegenwart von Aminoverbindungen und Peroxid entstehen. Freies Hydroxylamin konnte in Extrakten bisher nicht nachgewiesen werden, jedoch besteht die Möglichkeit des Vorkommens von gebundenem NH_2OH. Wie auch von Oesterheld (1970) erwähnt, werden in Zellextrakten von N-Mangelkulturen weder NH_4^+ Ionen gefunden, noch gelingt deren Oxidation mit Zellextrakten. Diese Versuche sind reproduzierbar. Ebenso verlief die Oxidation von Aminosäuren mit Peroxid unter katalytischer Wirkung von Zellextrakt negativ. Die Weiteroxidation von NO_2^- durch Peroxid unter chemischen und physiologischen Bedingungen (Phosphatpuffer pH 7) ist kein Problem.

Cresswell und Hewitt (1960) zeigten die Oxidation von NH_2OH durch Pflanzenextrakte. Auch N-Mangelextrakte von Ankistrodesmus katalysieren den Verbrauch von Hydroxylamin. Tabelle 7 bringt eine Übersicht von der Aktivität der N-Mangelextrakte.

Tabelle 7

HYDROXYLAMIN-OXIDASE IN N-MANGELEXTRAKTEN VON ANKISTRODESMUS VERSCHIEDENEN ALTERS

Alter der N/10 Kultur (Tage)	Verbrauch von NH_2OH (nMole/ml. 15 min.)	
	Enzym gekocht	Enzym
29	-	220
24	-	260
19	110	230
14	-	200
0	-	-

Testbedingungen wie unter Methoden beschrieben.

Es wurde ferner versucht, mit den im nächsten Abschnitt geschilderten Techniken die Oxidasetätigkeit auf dem Sacharose-Dichtegradienten zu lokalisieren (Abb. 12).

Oxidasetätigkeit ist auch bei Normalkulturen zu finden. Jedoch zeigt der Vergleich von Normal und N/10 Kultur, daß die Gesamtaktivität der letzteren wesentlich größer ist und neben der starken Abnahme bei Fraktion 14 - 16 (Chloroplastenbruchstücke) erhebliche Zunahme in den Fraktionen 4 - 7 aufweist. In diesem Bereich sind Partikel größerer Dichte mit Katalaseaktivität lokalisiert.

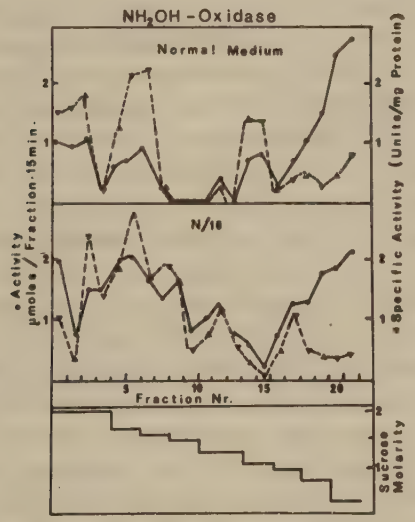


Abb. 12: Hydroxylamin-Oxidase Aktivität von Normal- und N/10 Kulturen (12 Tage) von Ankistrodesmus, Partikelfraktion 500 x g Überstand, aufgetrennt im Saccharose-Stufengradienten

2.1.6 Die Lokalisation von Enzymsystemen von Normal- und N/10 Kulturen von Ankistrodesmus braunii

Über Grundlagen, Technik und Bedeutung der Auftrennung von pflanzlichen Organellen und Partikeln im Saccharose-Dichtegradienten gibt es einige ausführliche Arbeiten (Tolbert 1960, 1971; Jacobi 1974; Richardson 1974). Für die Auftrennung der Partikel von Ankistrodesmus kamen die Techniken des analytischen, Stufen- und Auftriebsgradienten zur Anwendung. Auf eine Pelletierung irgendeiner Fraktion der differentiellen Zentrifugation wurde verzichtet, um Artefakte auf Grund der Sedimentierung zu vermeiden. Auf den Gradienten aufgetragen wurde in der Regel der 500 x g Überstand des Homogenats.

Abb. 13 zeigt die Auftrennung von Partikeln aus N/10 (12 Tage) und Normalkulturen (5 Tage) von Ankistrodesmus in einem für die Auftrennung der Partikel günstigen Stufengradienten. Dadurch werden Partikel häufig an der Grenzschicht zwischen 2 Stufen konzentriert. Bei Normalkulturen folgt die Verteilung der totalen Aktivität der Nitratreductase, Nitritreductase und der Hauptmenge der Katalase den beiden Proteinpeaks. Cytochrom c Oxidase liegt im Bereich geringerer Saccharose-Dichte. Die spezifische Aktivität als Anzeichen der stärkeren Konzentrierung des Enzyms folgt dieser Verteilung nicht unbedingt. Für Nitratreductase gibt es eine Übereinstimmung mit dem zweiten Chlorophyllpeak, Nitritreductase teilt sich in drei Maxima auf, während bei Katalase zwei neue Maxima im dichteren Bereich auftauchen. Die Cytochrom c Oxidase als Leitenzym der Mitochondrien zeigt unterhalb von Fraktion 15 eine unregelmäßige Verteilung über den ganzen Gradienten, da offensichtlich Bruchstücke von anderen Partikeln mitgenommen wurden. Insgesamt kann festgestellt werden, daß trotz Verfeinerung des Gradienten im mittleren Bereich eine Massierung von Zellmaterial die Auflösung erschwert.

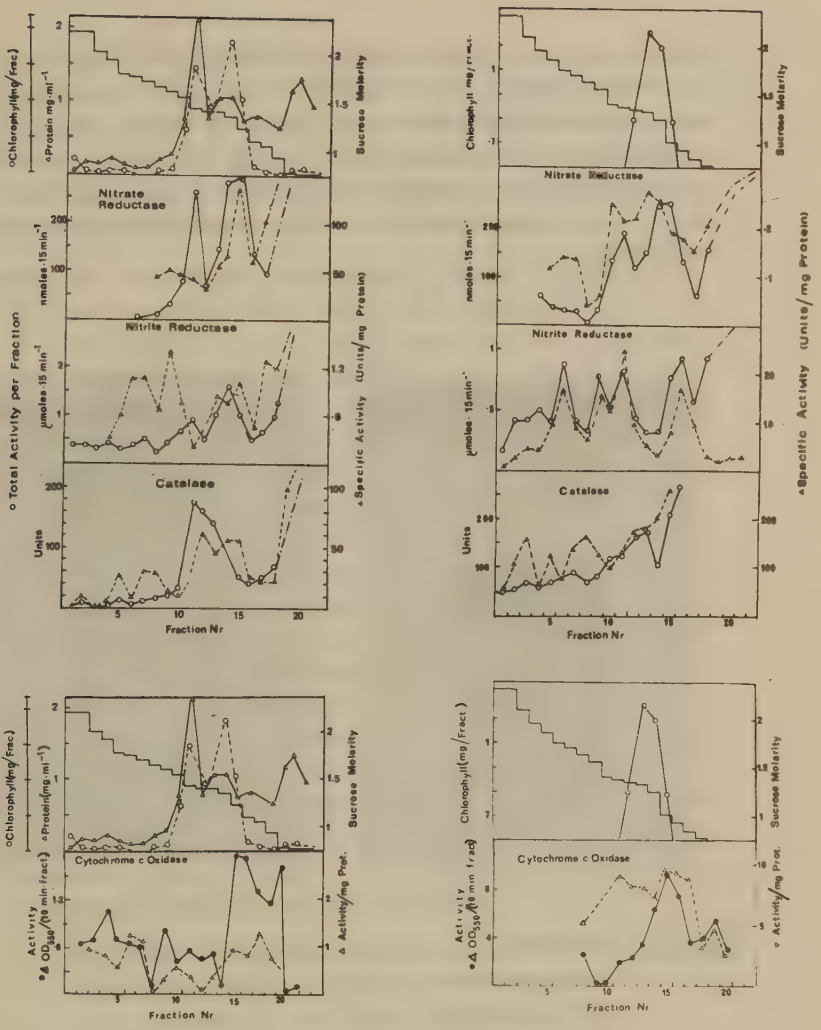


Abb. 13: Auftrennung des 800 x g Überstandes von Ankistrodesmus Partikeln im Stufengradienten

a) Normalkultur 8 Tage

b) N/10 Kultur 12 Tage

Bei N/10 Kulturen verringert sich die Verdichtung des Materials im mittleren Bereich. Nitratreductase weist einen Doppelpeak auf, Nitritreductase zeigt 4, wenn auch nicht deutlich getrennte Maxima, von denen 2 mit der Nitratreductase übereinstimmen. Katalase hat 3 'peaks', von denen der erste noch zu Vorfraktionen gehört, die in jedem Gradienten am Becherboden festeres Material konzentrieren.

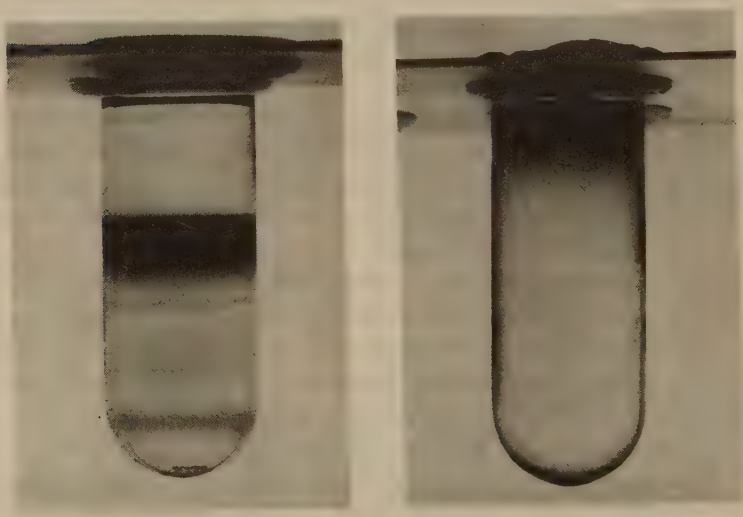


Abb. 14: Auftrennung von (a) Normalalgen-Partikeln im Auftriebsgradienten und (b) N/10 Algen-Partikeln im Stufengradienten, Kultur von 25 Tagen.

Die Auftrennung des 500 x g Überstandes im analytischen Gradienten (vgl. Abb. 17) mit feinster Abstufung der Dichte gibt keineswegs eine bessere Auflösung. Die interessierenden Enzyme liegen bis auf Cytochrom c Oxidase alle in zwei Fraktionen konzentriert und erlauben keine schlüssige Aussage. Nur Katalase zeigt zwei deutliche Vormaxima.

Ein Ausweg aus dem Problem der unzureichenden Trennung von Algenpartikeln bietet die Technik des Auftriebgradienten (Stabenau 1974). Hierzu wurden 10 ml des verdünnten 500 x g Überstandes im Stufengradienten der Abb. 13 getrennt, die Fraktionen der beiden mittleren Maxima vereinigt und auf 1,9 M an Saccharose gebracht. Diese Partikelfraktion wurde in einem zweiten Schritt auf die untere Schicht eines neuen Stufengradienten mit feiner Auflösung aufgetragen. Zentrifugationsdauer war allerdings 12 h. Abb. 14 zeigt die Schärfe der Auflösung von Partikeln, die ursprünglich in einer Zone konzentriert waren. Die Enzyme Nitrat- und Nitritreductase lassen sich nun eindeutig bestimmten Fraktionen zuordnen. Nitratreductase liegt im oberen Teil der Chloroplastenbruchstücke gemeinsam mit Glycolat-Dehydrogenase, Nitritreductase in einer Fraktion, in der auf Grund mikroskopischer Befunde ganze Chloroplasten konzentriert werden. Enzymatische Beweise für diese Annahme stehen noch aus. Die Aktivitätsverteilung der Katalase unterstützt die Annahme, daß bei einmaliger Trennung im Stufen- oder analytischen Gradienten schwerere Partikel, die Katalase enthalten, im Bereich der Chloroplasten aufgehalten werden.

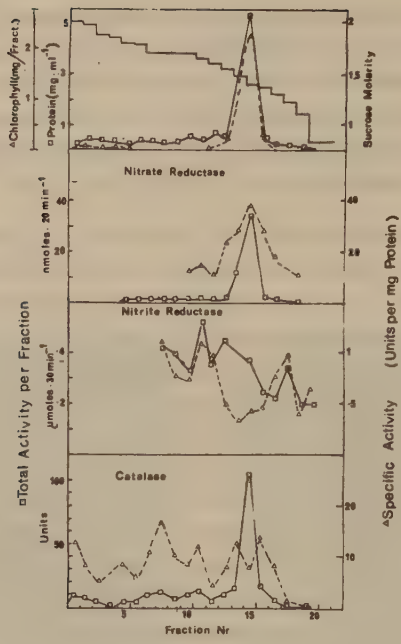


Abb. 15: Auftrennung von Normalalgen-Partikeln von Ankistrodesmus im Auftriebgradienten

Tabelle 8

GLEICHGEWICHTSDICHTEN VON LEITENZYMEN AUS ANKISTRODESMUS NORMAL- UND N/10 KULTUREN IM SACCHAROSE-DICHTEGRADIENTEN

Enzym	Normalkultur	N/10 Kultur
Katalase	1,213	1,234
	1,235	1,25
	1,25	
Cytochrom c Oxidase	1,166	1,165 - 1,175
Nitratreductase	1,18	1,16
	1,205	1,18
		1,208
Nitritreductase	1,217	1,217
	1,237	1,23
		1,245
Hydroxylaminoxidase	1,238	1,19
	1,245	1,25
Glycolatdehydrogenase	1,18	

Normalkultur 7 Tage alt, N/10 12 Tage. Zentrifugation 45.000 x g 4 h, in 60 ml Bechern mit einem Ausschwingrotor. Dichte in $g.cm^{-3}$.

Bei einem Vergleich der Gleichgewichtsdichten von Katalase (für Microbodies) und Cytochrom c Oxidase (für Mitochondrien) mit den Werten für höhere Pflanzen (Dalling et al. 1972) be-

steht Übereinstimmung mit 1,25 für Katalase, nicht jedoch für Mitochondrien (1,19 für Spinat). Außerdem existiert eine weitere Fraktion der Katalase, deren Dichte mit einer Fraktion der Nitritreductase übereinstimmt. Die dritte Fraktion der Katalase (Dichte 1,213) kann mit der Chloroplastenfraktion assoziert sein. Von den zwei Werten für Nitratreductase ist der höhere auf unvollständige Trennung des Materials zurückzuführen. Der Auftriebgradient zeigt, daß für Glycolatdehydrogenase und Nitratreductase die gleiche Dichte von 1,18 in der Fraktion der Chloroplastenbruchstücke gilt. Die Hydroxylaminoxidase wird in drei Fraktionen gefunden. Insgesamt gesehen überrascht, daß eine N/10-Partikelfraktion (Dichte 1,245) die Enzyme Katalase, Nitritreductase und Hydroxylaminoxidase enthält. Nitritreductase ist in jedem Fall in mindestens zwei Fraktionen zu finden, bei N-Mangel u.U. sogar in dreien. Eine Dichte für Nitritreductase (1,217) stimmt annähernd mit dem für höhere Pflanzen ermittelten Wert überein (Dalling et al. 1972) und ist nach mikroskopischen Befunden mit ganzen Chloroplasten assoziiert; auch nach Zentrifugation im Auftriebgradienten erscheint die Aktivität an dieser Stelle. Unterschiede in der Dichte zwischen Normal- und N/10 Kultur können auf eine Veränderung der Dichte bei N-Mangel oder das Auftreten von Isoenzymen zurückzuführen sein.

2.1.7 Charakterisierung des Enzyms der Glycolatoxidation

Die Aktivität eines oder verschiedener Enzyme, die Glycolat oxidieren können, ist im Überstand von Zellhomogenaten von Ankistrodesmus nachweisbar. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, ob das im Gradienten lokalisierte Enzym eine Oxidase oder Dehydrogenase ist. Nach den Kriterien von Nelson und Tolbert (1970) liegt eine Oxidase vor, wenn das Enzym nur L-Lactat

verwerten kann, unempfindlich gegen 2 mM CN^-, aber im DCPIP-Test sensitiv gegen O_2 ist. Das Enzym wird als Dehydrogenase klassifiziert, wenn es nur D-Lactat verwertet, durch 2 mM CN^- inhibiert wird und die anaerobe Rate der DCPIP-Reduktion auch weitgehend unter Luft beibehält. Abb. 16 zeigt die Kinetik der anaeroben Reduktion von DCPIP durch Glycolat. Keines der obengenannten Kriterien trifft für den Überstand voll zu. Beide Substrate werden mit der gleichen Rate umgesetzt, durch CN^- wird sogar eine Erhöhung des Umsatzes bewirkt.

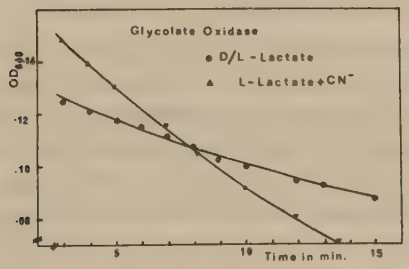


Abb. 16: Anaerobe Reduktion von DCPIP mit D- oder L-Lactat katalysiert von Ankistrodesmus Zellextrakt. (Reaktion nach Stabenau 1974, in Thunberg-Küvetten mit 0,02 M D-/L-Lactat; 2 mM KCN. Anfangswerte nicht synchronisiert; Enzym 0,2 ml Überstand)

Ähnliche Schwierigkeiten bei der Charakterisierung von Chlorella Glycolatoxidase werden von Codd et al. (1971) berichtet. Eine

Lösung dieses Problems sollte mit der direkten Analyse der Glucosegärungsprodukte von Ankistrodesmus möglich sein (siehe Kumar 1974). Dazu wurden die Algen 3 h anaerob in Glucosemedium im Dunkeln inkubiert und anschließend Lactat colorimetrisch nachgewiesen. Schließlich wurde das gebildete Lactat im Enzymtest mit NAD^+ und D-LDH bzw. L-LDH inkubiert (Kumar 1974). Nach Abzug der endogenen Rate der NAD^+ Reduktion zeigte nur der Ansatz mit D-LDH eine meßbare Rate. Somit ist das Glycolatoxidierende Enzym in Ankistrodesmus braunii definitionsgemäß eine Dehydrogenase.

2.1.8 Katalase und der Nachweis von Microbodies

Nach der ursprünglichen Definition (Silverberg und Sawa 1974) sind Microbodies cytoplasmatische Organelle, umgeben von einer Membran, die cytochemisch Peroxidasewirkung von Katalase zeigen und mindestens ein Peroxid-erzeugendes Enzym besitzen. Inzwischen sind eine Reihe von Befunden bekannt geworden, die diese Definition stark in Frage stellen (Diskussion dazu siehe Codd et al. 1973). Der cytochemische Nachweis wird nämlich mit Diaminobenzidin durchgeführt, das nach oxidativer Polymerisation elektronenmikroskopisch ein elektronendichtes Kontrastmittel darstellt und das in wässerigem Milieu ausflockt. Während also ursprünglich die positive Reaktion mit DAB als Indiz für die Gegenwart von aktiver Katalase gewertet wurde, hat man in der Zwischenzeit Microbodies ohne Katalase, aber mit DAB-Reaktion / Microbodies mit aktiver Katalase aber ohne DAB-Reaktion / sowie eine DAB-Reaktion ohne Microbodies in den Mitochondrien gefunden. Da auch bei Ankistrodesmus gute Katalaseaktivität nachweisbar ist, scheint die Fragestellung nach der Existenz von Microbodies durchaus berechtigt (vgl. Abb. 17).

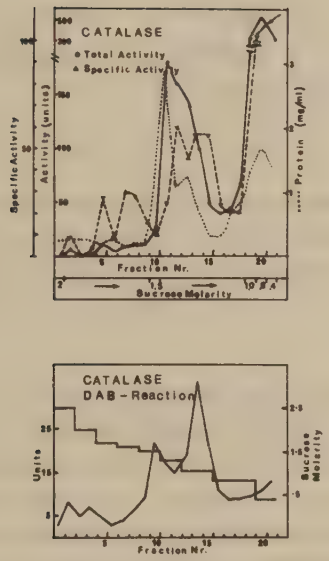


Abb. 17: Katalase-Aktivität des 500 x g Überstandes von Ankistrodesmus Partikelfraktionen einer 7 Tage Normalkultur, aufgetrennt im analytischen Saccharosegradienten.

Während man früher das Präzipitat der DAB-Reaktion als Schwärzung auf dem elektronenmikroskopischen Bild mehr oder weniger deutlich wahrnehmen konnte, gibt es seit dem Erscheinen der Arbeit von Fahimi und Herzog (1973) die Möglichkeit, eine eventuell peroxidative Wirkung colorimetrisch zu verfolgen (siehe Methoden).

a) Reaktion von Katalase (Rind) mit DAB und O_2^{2-}

Zusatz	Peroxid 30 µMole	Peroxid 1,5 µMole	Peroxid 0
+ Katalase	0,163	0,09	0,08 (OD_{450})
- Katalase	0,77	0,2	0,078 (OD_{450})

Reaktionsansatz wie im DAB Standardtest mit $0{,}15 \cdot 10^{-3}$ mg Enzym. Reaktionszeit 1 h bei 37°C; OD_{540} nach 10 h.

Die 'in vitro'-Reaktion zeigt zunächst, daß die Kontrollen ohne Enzym guten Umsatz gebracht haben im Vergleich zur O-Kontrolle: - Peroxid / - Enzym. Von einer peroxidativen Wirkung der käuflichen Katalase kann also überhaupt nicht die Rede sein. Im Gegenteil verhindert sie durch Zersetzung des Peroxids die oxidative Polymerisation des DAB, die durch steigende Konzentration von Peroxid begünstigt wird. Die Wirksamkeit von Katalase vom Rind und von Ankistrodesmus wurde zuvor im Enzymtest nach Lück (1965) sowie in Gegenwart des spezifischen Inhibitors Aminotriazol (0,02 M resultiert in 90 % Hemmung) geprüft.

b) Reaktion von DAB mit Peroxid und geeigneten Substraten

SUBSTRAT	Oxidation von DAB im DAB Standardtest (gemessen als OD_{450}) Probe	Probe + 0,01 M CN^-
Aminotriazol (0,02 M)	0,102	
Glycylglycin (2µ Mole)	0,08	0,02
Glycin (")	0,123	0,02
Glutamin (")	0,12	0,02
Alanin (")	0,092	0,02
Serin (")	0,113	0,021
- Substrat	0,026	

Reaktionszeit 2,5 h bei 45°C, Puffer pH 9

Aminotriazol ist ein Inhibitor der enzymatischen Katalasereaktion. Im DAB-Test bringt ein Zusatz in jedem Fall eine Steigerung des Umsatzes. Wie die voranstehende Aufstellung deutlich beweist, gibt der Zusatz jeder Aminoverbindung eine positive Reaktion mit DAB, auch ohne Enzym. Beide Aufstellungen a) und b) weisen darauf hin, daß die cytochemische Verwendung der DAB-Reaktion als Indiz für Katalase mit großer Wahrscheinlichkeit ein Irrtum ist und somit auch kein Beweis für Microbodies. Andererseits ist die Reaktion bei Inkubation ohne Peroxid ein Hinweis - bei positiver Aussage - auf die Bildung von Peroxid und verwertbare primäre Aminoverbindungen, z.B. auch Aminosäuren. Da Microbodies u.a. auch Umschlagsort für Aminosäuren sind, könnte eine positive DAB-Reaktion auf deren Vorhandensein schließen lassen, in diesem Fall ist aber die Gegenwart von Katalase nicht zwingend. Mit dieser Hypothese lassen sich die anfangs angezeigten Widersprüche aufheben.

Elektronenmikroskopische Befunde von Normalzellen von Ankistrodesmus weisen selbst ohne Inkubation mit DAB auf die Existenz von runden, meist ovalförmigen Microbodies im Allgemeinen hin (Tafel 6). Diese sind häufig zwischen Kern und Chloroplast, aber auch zwischen Kern und Mitochondrien lokalisiert. Vergleiche von verschiedenen Schnitten deuten auf das Vorkommen von mehr als einem Microbody pro Zelle hin. Diese Zellorganelle sind auch ohne Reaktion mit DAB zu erkennen. Mit DAB/O_2^{2-} inkubierte Zellen zeigen den Randbereich der Microbodies stärker kontrastiert als das Zentrum, aber auch bestimmte Bereiche im Organell stärker gefärbt als andere (Tafel 9, Bild 1). Bei größerer Auflösung zeigt die Kontrastierung das Vorliegen einer Membran (Tafel 9, Bild 2).

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse von a) der enzymatischen Aktivität der Katalase in Dichtegradientenfraktionen von 1,23 bis 1,25 $g.cm^{-3}$ Dichte, b) dem elektronenmikroskopischen Nachweis von Organellen mit singulärer Membran 'in situ', kann auf Existenz und Funktion von Microbodies in Ankistrodesmus geschlossen werden.

2.2 N-Mangel bei Chlorella fusca

Zusammenfassende Darstellungen über Wirkungen von N-Mangel bei Chlorella-Stämmen als taxonomisches Merkmal existieren von Kessler et al. (1963), sowie Kessler (1967). Neuerdings wurde über das Wiederergrünen von N-Mangelkulturen von Chlorella fusca 211-15 berichtet (Grimme und Porra 1974). Eine gründliche Analyse der morphologischen, physiologischen und biochemischen Vorgänge bei drastischen Änderungen im Stickstoffhaushalt von Chlorella steht noch aus. Der folgende Abschnitt ist als Anregung zu weiteren Untersuchungen gedacht.

2.2.1 Wachstumskurve von Chlorelle fusca bei N-Mangel

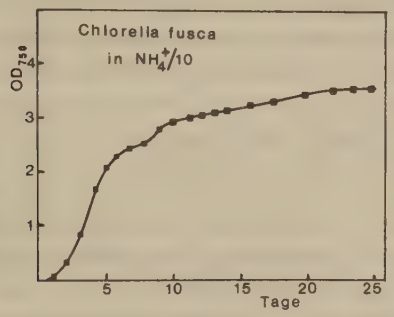


Abb. 18: Wuchsverhalten von Chlorella fusca nach Überimpfen einer älteren N-Mangel Kultur auf neues N/10 Medium

Der Verlauf der Kurve zeigt, wie schon bei Ankistrodesmus im vorangegangenen Abschnitt belegt, typische Zweiphasigkeit. Auf einen schnellen Anstieg, in dem das Wiederergrünen der ursprünglich orangefarbenen Kultur stattfindet, folgt nach 7 - 8 Tagen ein kurzer Einschnitt mit anschließendem allmählichem Übergang in die Stationärphase. Dieser Verlauf ähnelt sehr der Wachstumskurve der N/10 Kultur (Dunkel-Glucose) bei Ankistrodesmus (vgl. Abb. 8).

2.2.2 Das kurzzeitige Auftreten von Sexualstadien von Chlorella bei Änderungen im Nährmedium

In den einschlägigen systematischen Werken über Grünalgen wird erwähnt, daß die Vermehrung der Chlorococcalen Chlorella

und Ankistrodesmus durch Autosporen erfolgt (Fott 1971, Bourrelly 1966). Ein knapper Hinweis in der Nat. Rundschau berichtet über das momentane Auftreten von ungewöhnlichen Stadien bei Chlorella vulgaris (H. W. 1965). Diese Beobachtungen können nun zum Teil bestätigt werden. Zwar ist es nicht einfach, an der Grenze der Auflösung des Lichtmikroskops ablaufende Vorgänge zu verfolgen, doch ermöglichen Kulturbedingungen unter N-Mangel bzw. Fe-Mangel (siehe 1. Teil), diese Stadien reproduzierbar anzuziehen.

Impft man eine ältere N-Mangel Kultur (Vollmedium, Minimalmedium + Glucose, Normalmedium) auf eine neue N/10 Kultur über, so kann man nach 24 h bis 3 Tagen eine Reihe von Stadien beobachten, die in sich normal teilenden Kulturen nicht beobachtet werden können (Tafel 5, 7). Zunächst überwiegen sogenannte Zweierstadien, die man für stehengebliebene Zellteilungsstadien halten könnte (Tafel 5, Nr. 1, 2; vgl. auch Stadien bei Fe-Mangel). Diese differenzieren sich aber weiter und wachsen zu bohnen- bis schlauchförmigen Gebilden aus. Auf Grund ihrer Weiterentwicklung kann man sie wohl als unbewegliche Gameten bezeichnen. In der Folge findet man den Kontakt und die beginnende Fusion dieser Doppelstadien (Tafel 5, Nr. 3, 4). Weiterentwickelte Stadien werden gefunden in unregelmäßig geformten Zellsäcken, mit in der Regel 4 Tochterzellen (Tafel 5, Nr. 6). Nach Aufreißen des gemeinsamen Zellsackes werden die Tochterzellen frei (Tafel 5, Nr. 8). Auch eine gealterte N-Mangelkultur zeigt den Beginn dieser Entwicklung (Tafel 6, Nr. 1 - 3). Die Bildung von Doppelstadien (Nr. 1, 2) aber auch Kopulationsstadien (3) kann nach mehr als 4 Wochen beobachtet werden. Die Differenzierung zu nicht vegetativ sich teilenden Zellen setzt also schon bei längerem N-Mangel ein, außerdem verhalten sich nicht alle Zellen gleich.

Impft man nun diese N-Mangelkultur auf ein frisches N/10 Medium, so geht die Weiterentwicklung nur eine gewisse Zeit voran (vgl. Wuchskurve Abb. 18). Mikroskopisch beobachtet man Kopulationsstadien auch ohne ausgeprägten Zellschlauch (Tafel 7, Nr. 1 - 3), die man als Fusion zweier Zellstadien verstehen kann. In Tafel 7, Nr. 2 erkennt man die Bildung eines Tetradenkörpers.

Die Beobachtung dieser Stadien ist aber nicht nur auf N- oder Fe-Mangel beschränkt. Ältere Kulturen zeigen im allgemeinen irgendeine Form von Mangel, die den Organismus, in unserem Fall Ankistrodesmus oder Chlorella, zu einer wie auch immer gearteten Differenzierung veranlaßt. Auch beim einfachen Überimpfen einer stationären Kultur auf frisches Nährmedium können bei Ankistrodesmus abweichende Stadien festgestellt werden. Unter autotrophen Bedingungen gehen die Prozesse nur so schnell vor sich, daß sie nur im geeigneten Moment bei sorgfältiger Beobachtung gefunden werden. Genetisch erhebt sich die Frage nach der Rekombination, da in den obenangeführten Fällen nur ein Stamm untersucht wurde (Cf. Kessler, Symp. Tax. Algae 1974). Die Fusion von Zellen zweier, auch optisch unterscheidbarer Stämme von Chlorella bei Fe-Mangel konnte von S. Eisenmeier in unserem Labor beobachtet werden.

Die bei Fe- und N-Mangel in Kulturen von Ankistrodesmus braunii und Chlorella fusca gefundenen Erscheinungen, belegt durch Wachstumskurven und morphologische Stadien, werden von uns als Hinweis auf das Vorkommen von Sexualität bei diesen Algenstämmen angesehen.

IV. Diskussion

Die vermehrte Bildung von Flavodoxin in Chlorella fusca unter verschärftem Fe-Mangel ist ein Indiz für tiefgreifende Änderungen im Stoffwechsel. Der Chloroplast mit seinem hohen Gehalt an Cytochromen, gebundenem Eisen und löslichen, eisenhaltigen Elektronencarriern reagiert mit einem teilweisen Abbau der Protein-Chlorophyllkomplexe. Die Wachstumskurven demonstrieren, wie der Organismus schon bei Zugabe geringster Mengen des essentiellen Elementes mit einem Zuwachs antwortet. Zweiphasigkeit bedeutet auch eine gewisse Flexibilität. Verbrauch der Fe-pools, Verdünnung der Fe-Konzentration, Umsteuerung des Stoffwechsels mit Abbau weniger wichtiger und vielleicht gesteigerter Synthese essentieller Proteine zeigen sich in verminderter Wuchsrate. Die Spektren weisen auf die bevorzugte Bildung von Komponenten hin, die in anderen Bereichen absorbieren. So kann die Zunahme der Absorption zwischen 500 und 600 nm vielleicht mit dem Auftreten der Semichinonform des Flavodoxin in Zusammenhang gebracht werden.

Ferredoxin wurde in Mikroorganismen und in vielen höheren Pflanzen gefunden, Flavodoxin wurde aus einer Reihe von Bakterien, Phytoflavin aus Anacystis, einer Blaualge, isoliert (vgl. Review von Yoch und Valentine 1972, sowie Bothe 1968, Smillie und Entsch 1971). Von zwei Flavodoxinen kennt man bereits die Primärstruktur auf Grund von Röntgenstrukturanalyse und Aminosäuresequenzermittlung. Flavodoxin aus Chlorella ist das erste aus Eukaryonten isolierte Flavoprotein dieser Gruppe. Mit einem Molekulargewicht von 22.000, FMN als prosthetischer Gruppe und der Eigenschaft der Carrierfunktion in der photosynthetischen NADP-Reduktion erfüllt es die Klassifizierungsmerkmale.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, geht Flavodoxin aus Chlorella durch zwei Redoxzustände bis zum Hydrochinon.

Die Reduktion läßt sich mit EDTA im Licht, mit Formamidin-Sulfinsäure und mit Ditionit erreichen.

Die schnelle Absorptionsänderung von Flavodoxin zu Beginn der Reaktion zeigt die Reduktion eines Teils bis zum Hydrochinon, andererseits aber erst allmählich die Bildung des Semiquinons. Diese Änderungen können mit einem 2-Elektronenschritt am Anfang, gefolgt von einer Komproportionierung der vollreduzierten mit der oxidierten Form zur Entstehung des Semiquinons gedeutet werden (vgl. Mayhew und Massey 1973). Das Semiquinon ist bei Reoxidation relativ stabil. Diese Ergebnisse weisen daher auf die Möglichkeit von 1- und 2-Elektronenübergängen hin.

Die spektralen Eigenschaften von Chlorella Flavodoxin zeigen die Verwandtschaft mit anderen Flavodoxinen. Molare Extinktionkoeffizienten der Maxima und isosbestische Punkte bei Übergang von einer Redoxform in die andere sind zwar nicht identisch, weichen aber wenig von den Werten für Chlostridium Flavodoxin ab (Mayhew 1970). Die Abwesenheit von Metallen hat es mit anderen Flavodoxinen gemein.

Für die funktionale Rolle kommen die Nitrat-, Nitrit-, Sulfit- und Hydrogenase-Reaktion in Frage. In dieser Arbeit wurde bereits die von Smillie und Entsch (1971) gezogenen Schlußfolgerungen widerlegt, daß ein Flavodoxin eine direkte Rolle bei der Nitratreduktion spielt. Umsatzraten im normalen Nitratreductase-Test mit Flavodoxin als Carrier können unter anaeroben Bedingungen zum Flavin-Flavin Kontakt zwischen Fld.H_2 und freiem FMN führen, denn letzteres kann am terminalen Ende der Nitratreduktion angreifen.

Anders sieht es dagegen mit der Kopplung an Nitritreductase aus. Zunächst konnte in Vorversuchen geklärt werden, daß es keine nennenswerte Reduktion von Nitrit durch Fld/$S_2O_4^{2-}$, oder Fld/

EDTA/Licht gibt. Bothe (1969) konnte eine Phytoflavin-katalysierte Reduktion von Nitrit nicht feststellen. Hochgereinigte Nitritreductase und Flavodoxin aus Chlorella ergeben aber, wie gezeigt wurde, mit geringen Mengen (5 nMole) gut meßbare Reaktionsraten im Nitritreductase Standardtest. Die Bildung des Endproduktes NH_4^+ konnte routinemäßig nachgewiesen werden. Unter anaeroben Bedingungen ist der Umsatz leicht erhöht, der Zusatz von ATP bringt keine nennenswerte Steigerung. Die Rolle des ATP bei der Nitrit Assimilation in weiterem Sinne (vgl. Hofmann 1971) scheint damit auf sekundäre Prozesse, wie die Bindung des NH_4^+ an organische Akzeptoren oder auf Transportprozesse beschränkt zu sein.

Als Vergleichsorganismus für die Isolierung von Flavodoxin aus Chlorella diente Ankistrodesmus. Obschon Absorptionsspektrum und Wuchskurvenverlauf Parallelen in der Reaktion auf abgestuften Fe-Mangel zeigten, konnte ein homogenes Flavoprotein mit Flavodoxineigenschaften nicht isoliert werden. Statt dessen erhält man bei Anwendung ähnlicher Präparationstechniken eine Proteinfraktion, die eher als Flavoproteinkomplex bezeichnet werden kann und die, wenn auch in geringerem Maß, zwei Kriterien erfüllt: Vermittlung in der photosynthetischen NADP-Reduktion und in der NO_2^--Reduktion. Die weitere Auflösung des Komplexes steht noch aus.

Chlorella fusca und Ankistrodesmus braunii gemeinsam ist bei Fe-Mangel das Auftreten ungewöhnlicher Zellstadien nach Eintritt in die 2. Wachstumsphase, das bis in die Stationärphase anhält. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Chlorella vulgaris 211-11q gemacht, es wurden Einzelzellen mit Auswüchsen und Verschmelzungsstadien mit Schläuchen festgestellt. Der Schluß liegt nahe, daß es sich in allen drei Fällen um Sexualstadien handelt.

In der Aufklärung der unmittelbaren Prozesse, die bei N-Mangel zur Umsteuerung des gesamten Stoffwechsels führen (Oesterheld 1971), steht man erst am Anfang. Zwar konnten die von Syrett und Hipkin (1973) gebrachten Einwände gegen die intrazelluläre Nitrit- und Nitratbildung auf Grund methodischer Mängel zurückgewiesen werden, doch bleibt selbst bei Verfeinerung der Bestimmungsmethoden die Menge an nachweisbarem oxidiertem Stickstoff sehr klein. Dies ist verständlich, da Nitrit und Nitrat von N-Mangelkulturen sehr rasch assimiliert werden und die Enzyme der N-Assimilation hohe Aktivität besitzen. Bei Aufstellung einer Wuchsreihe konnte daher auch nur bei Nitrat ein Maximum nach 12 - 16 Tagen, zur Zeit der höchsten Nitratreductaseaktivität, festgestellt werden. Ähnliches mag für andere Zwischenstufen der Nitrifikation gelten. Freies Hydroxylamin ist nicht nachweisbar, doch lassen sich im Dichtegradienten Fraktionen mit erhöhter NH_2OH-Oxidase-Tätigkeit lokalisieren.

Die sorgfältige Analyse der Wachstumskurven bei N-Mangel ergibt 2-Phasigkeit. Das kann zunächst als reine Analogie zum verwandten Phänomen bei Fe-Mangel gelten, also als Umsteuerung des Stoffwechsels mit geringerer Wuchsrate. Bei starker Belichtung findet eine Degradation von Chlorophyll statt, stärker als der Abbau von Protein (Aach 1953). Dunkelkontrollen dagegen bleiben grün und zeigen ein unverändertes Spektrum. Daß nur bei starker Belichtung Nitrit und Nitrat entstehen, kann ausgeschlossen werden, da auch bei Dunkelkontrollen und bei Dunkel/Glucose beide Ionen nachweisbar sind. Das Absorptionsspektrum einer N/10 Kultur von Dunkel/Glucose zeigt den weitgehenden Verlust von lichtabsorbierenden Pigmenten. Das Vorkommen von oxidiertem Stickstoff in allen N-Mangel-Kulturen unterstützt daher das Konzept der heterotrophen Nitrifikation.

Die Annahme, daß bei diesem Prozess oxidierende Vorgänge eine Rolle spielen, führte zu chemischen Modellversuchen, in denen reduzierte N-Verbindungen mit Peroxid zur Reaktion gebracht wurden. Wie gezeigt, produziert ein 'in vitro'-System von NH_2OH, EDTA und O_2^{2-} in Phosphatpuffer bei pH 7.8 meßbare Mengen an Nitrit in Abhängigkeit von der Zeit. Die Aufoxidation zu Nitrat in Gegenwart von Peroxid ist dann chemisch kein Problem mehr. Mit NH_4^+ oder Aminosäuren in Gegenwart von Peroxid war der Umsatz unbedeutend.

Für biologische Vorgänge bedeutsamer erscheint die Oxidation von NH_2OH im Testsystem von Cresswell und Hewitt (1960) mit N-Mangel Extrakten. Auch hier konnten geringe Mengen an Nitrit gemessen werden. Die Annahme, daß oxidierende Enzyme, wie peroxidativ wirkende Katalase, organischen Stickstoff zu Nitrit oxidieren, wird durch das gleichzeitige Auftreten von Katalase und NH_2OH-Oxidase in Dichtegradientenfraktionen unterstützt. Diese Fraktionen können auf Grund ihrer Dichte von 1,25 auch Microbodies enthalten. Daß dieses Enzymkomplement Nitrit produzieren könnte, wird von den Befunden von Molina und Alexander (1972) unterstützt, die eine Oxidation von Nitrit durch Aspergillus flavus Extrakte und von NH_2OH durch Peroxidase und Katalase gefunden haben.

Die Existenz von Microbodies auch in Algen (Gergis 1972, Brody und White 1972) wirft erneut das Problem der Lokalisation von Nitrat- und Nitritreductase auf. Der Vergleich des Auftretens dieser Enzyme von Normal- und N-Mangelkulturen in drei Dichtegradienten-Typen kann zur Erhellung des Problems beitragen.

Die Befunde von Lips und Avissar (1972), das Vorkommen von Nitrat- und Nitritreductase ausschließlich auf Microbodies zu beschränken, wurde auch aus technischen Gründen - 'pelleting' von 500 x g Überständen - von Dalling et al. (1972) zum Teil

widerlegt. Die letztgenannten Autoren lokalisieren die Nitritreductase von Spinatblättern nur in den Chloroplasten, während Nitratreductase wegen unspezifischer Adsorption an Serumalbumin aus der Diskussion genommen wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Ankistrodesmus zeigen, daß Nitritreductase von Normalkulturen in zwei, von N-Mangelkulturen in drei Fraktionen des Gradienten vorkommt. Eine der Fraktionen kann einheitlich der Fraktion der ganzen Chloroplasten zugeordnet werden, eine weitere entspricht mit einer Dichte von 1,23 wahrscheinlich den Proplastiden, die dritte hat die Dichte von Microbodies 1,25. Diese Ergebnisse stützen also die Befunde beider obengenannten Arbeitsgruppen.

Anders liegen die Verhältnisse bei der Nitratreductase. Zwar konnte der Adsorptionseffekt mit Serumalbumin zum Teil reproduziert werden, jedoch blieb nach einer zweiten Gradientenzentrifugation im Auftriebgradienten die Aktivität der Nitratreductase allein mit einer Chloroplastenfraktion assoziiert, die weder Nitritreductase, Katalase, jedoch Glycolat-Dehydrogenase enthielt. Damit wird andererseits die Hypothese von Roth-Bejerano und Lips (1973) unterstützt, daß die Aktivitäten von Nitratreductase und Glycolat-Dehydrogenase miteinander assoziiert sind, wenigstens funktionell mit Chloroplastenstrukturen. Dieses Glycolat oxidierende Enzym wurde in der vorliegenden Arbeit als Dehydrogenase klassifiziert, im Unterschied zu den Oxidasen höherer Pflanzen. Das Auftreten der Nitritreductase in mindestens zwei verschiedenen Fraktionen wird durch die experimentellen Befunde von Oesterheld (1971) und Kessler (1957) unterstützt, demzufolge man einen assimilatorischen von einem dissimilatorischen Typ unterscheiden kann, von denen der erstere auch bei N-Mangel aktiv ist.

Weitere Untersuchungen könnten eruieren, ob die Assoziation von Nitritreductase, Hydroxylaminoxidase und Katalase einen nitri-

fizierenden Komplex darstellt und wo etwa die Hydrogenase einzuordnen wäre.

"Sexualität hat primär nichts mit Vermehrung zu tun, denn ihr ursprünglicher Sinn ist die Rekombinantenbildung und damit die Multiplikation der Erbtypenvielfalt." (Kaplan, S. 204, 1972)

Nach herkömmlicher Definition gehören Chlorella und Ankistrodesmus zur 3. Ordnung der Grünalgen, den Chlorococcales, Chlorella zur Familie der Oocystaceae, Ankistrodesmus zur Familie der Ankistrodesmaceae. In beiden Fällen erfolgt Vermehrung nur durch Autosporen (Fott 1971). Diese herrschende Meinung hat sich bisher gehalten, obwohl in der Literatur genügend Hinweise, morphologisch (Nat. Rdsch. 1980, H. W.) und physiologisch bzw. biochemisch zu finden sind, die Sexualität implizieren. Dazu gehört das Phänomen der Reversion bei Mutanten (Kessler und Czygan 1966), wie die Divergierung im GC-Verhältnis innerhalb von Chlorellastämmen (Hellmann 1973). Auch von Scenedesmus wurde das Auftreten von Sexualformen bei N-Mangel (Trainor und Burg 1965) sowie die Reversion von Photosynthese-Mutanten (Raps 1973) berichtet.

Die Bedeutung von einzelnen begrenzenden Faktoren für die Wachstumsrate von Kulturen wurde bei Algen bisher offensichtlich etwas unterschätzt. O'Brien (1972) empfiehlt die Bestimmung des Wachstumsverhaltens von Phytoplankton mittels der Wachstumsrate. Die in dieser Arbeit untersuchten Organismen antworten bei Fe- und bei N-Mangel mit einer Änderung der Wachstumsrate nach Verbrauch des entsprechenden Elementes.

Bei Fe-Mangel sind in der 2. Phase und im stationären Zustand Stadien zu beobachten, die gewöhnlich sehr schwer zu finden sind. Diese Stadien repräsentieren nicht etwa stehengebliebene Teilungen, auch diese findet man, sondern ungewöhnliche Doppelzel-

len mit einem schmäleren Oberteil, dessen weitere Differenzierung oft erst dann wieder einsetzt, wenn die Kultur in ein frisches Medium mit der fehlenden Komponente gesetzt wird.

Sexualität unter N-Mangel ist an und für sich nichts Neues. Bei Chlamydomonas beginnt die Gametogenese mit dem Entzug der N-Quelle (Sager und Granick 1954). Im vorliegenden Fall gehen die Kulturen von Chlorella und Ankistrodesmus nach Verbrauch von N/10 in eine Induktionsphase, die bei N/10 - Dunkel - Glucose sogar als Ruhestadium angezeigt wird. Danach nimmt die Zellzahl noch eine Zeitlang zu bis zum Erreichen der Stationärphase. Im Schnittpunkt der beiden Phasen kann man bei Ankistrodesmus Paarung, Plasmogamie und Zygotenbildung beobachten, äußerlich sichtbar am Ausflocken und Sedimentieren der Zellen. Die Optische Dichte nimmt in dieser Zeit nicht zu. Eine Erklärung bietet die an der Grünalge Spirogyra gemachte Beobachtung, daß während der Konjugation die Nukleinsäuresynthese unterbrochen ist (Sasaki et al. 1972). Mikroskopisch sind bei Chlorella und Ankistrodesmus von der Norm abweichende, gametenähnliche Zellstadien bei fortdauerndem N-Mangel gut zu erkennen. Auch Kopulationsstadien werden bei Ankistrodesmus im N-Mangel gut konserviert.

Auf Grund dieser Beobachtungen findet sich vielleicht eine neue Erklärung für das Phänomen der Nitrifikation bei Ankistrodesmus: die Umdifferenzierung von Normalzellen zu Gameten und die Bildung neuer Tochterzellen innerhalb der Zygoten. Nach Siersma und Chiang (1971) werden bei der Gametogenese von Chlamydomonas über 90 % der Ribosomen des Chloroplasten und des Cytoplasma eingeschmolzen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß Fe- und N-Mangel-Phänomene bei Chlorella Fusca und Ankistrodesmus braunii offensichtlich begleitet werden von Prozessen der Umschaltung von der vegetativen zur generativen Phase.

V. Zusammenfassung

1. Der Einfluß der limitierenden Bedingungen von Eisen und Stickstoff auf das Wachstum nicht-synchroner Kulturen von Chlorella fusca und Ankistrodesmus braunii wurde morphologisch und in ausgewählten biochemischen Aspekten untersucht.

2. Bei Senkung des Spiegels von Fe auf 1/100, 1/200 und von N auf 1/10 lassen sich deutlich Wachstumsphasen mit unterschiedlicher Neigung unterscheiden.

3. Mikroskopische Befunde weisen auf die Entwicklung von Sexualstadien hin, die bei N-Mangel im Umbruchsbereich der Wachstumsphasen auftreten. Diese Stadien können nicht als stehengebliebene Teilungsstadien betrachtet werden.

4. Bei Fe-Mangel werden offensichtlich als Ersatz für Fe-haltige Carrier Flavoproteine gebildet. Flavodoxin aus Chlorella wurde isoliert, kristallisiert und zum Teil charakterisiert. Es tritt in 3 spektral unterscheidbaren Redoxzuständen auf und hat eine funktionale Rolle in der NADP- und Nitritreduktion.

5. Die Befunde von Oesterheld und Kessler bezüglich des Auftretens von Nitrit und Nitrat in N-Mangel-Kulturen konnten erhärtet werden.

6. Untersuchungen zur Lokalisierung von Nitrat- und Nitritreductase in Normal- und N/10 Kulturen von Ankistrodesmus ergaben den Hinweis auf die Existenz von Microbodies. Nitritreductase läßt sich in Normalalgen in 2, in N-Mangelalgen in 3 Fraktionen nachweisen. Das Vorkommen von Nitritreductase, Hydroxylamin-Oxidase und Katalase in einer Fraktion wird diskutiert.

7. Nach Anwendung der Technik des Auftriebgradienten sind Nitratreductase und Glycolat-Dehydrogenase in der leichteren Chloroplastenfraktion lokalisiert. Letzteres Enzym wurde als Dehydrogenase klassifiziert.

8. Microbodies von Ankistrodesmus wurden elektronenmikroskopisch nachgewiesen.

VI. Literatur

AACH, H. G., Arch. Mikrobiol. 19, 166 (1953)

AHMED, J., SPILLER, H., Plant & Cell Physiol. im Druck

ARNON, D.I., Plant Physiol., 24,1(1948)

ARNON, D.I., STOUT, P.R., Plant Physiol. 14, 371 (1939)

ANDERSON, J.M., BOARDMAN, N.K., DAVID, D.J., Biochem. Biophys. Res. Comm., 17, 985 (1964)

BÖGER, P., Flora 154, 174 (1964)

BÖGER, P., Ztschr. Pfl. Physiol., 61, 447 (1969)

BOTHE, H., Dissertation, Göttingen (1968)

BOTHE, H., in: H. Metzner ed., Progress in Photosynth. Res. 3, 1483, H. Laupp, Jr., Tübingen (1969)

BRODY, M., WHITE, J.E., Develop. Biol., 31, N. 2, 348 (1973)

BOURRELLY, P., Les Algues d'eau douce I, Ed. N. Boubeê, Paris (1966)

CARDENAS, J., RIVAS, J., PANEQUE, A., LOSADA, M., Archiv. Mikrobiol. 81, 260 (1972)

CODD, G.A., SCHMID, G.H., KOWALLIK, W., Archiv Mikrobiol. 92, 21 (1973)

CRESSWELL, C.F., HEWITT, E.J., Biochem. Biophys. Res. Comm. 3, 544 (1960)

DALLING, M.J., TOLBERT, N.E., HAGEMAN, R.H., Biochem. Biophys. Acta, 283, 505 (1972)

FAHIMI, H.D., HERZOG, V., Journal Histochem. Cytochem. 21, N. 5, 499 (1973)

FOTT, B., Algenkunde, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1971)

FREAR, D.S., BURRELL, R.C., Anal. Chem. 27, 1664 (1955)

GAWEHN, K., BERGMEYER, H.U., Method. der Enzym. Anal., Hrsg. H.U. Bergmeyer, 2. Aufl. Vol 2, S. 1450, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1970)

GERGIS, M., Planta 101, 180 (1971)

GRIMME, L.H., PORRA, R.J., Arch. Microbiol. 99, 173 (1974)

GRIS, E., Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 19, 1118 (1844)

HEWITT, E.J., NICHOLAS, D.J.D., in Methods of Plant Analysis 7, 67, Hrsg. Paech K., Tracey, M.V., Berlin, Springer Verlag (1964)

HOFMANN, A., Planta, 102, 72 (1972)

HELLMANN, V., Dissertation, Erlangen (1973)

JACOBI, G., Biochemische Cytologie der Pflanzenzelle, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1974)

KAPLAN, R.W., Der Ursprung des Lebens, G. Thieme Verlag, Stuttgart (1972)

KELLNER, K., Biol. Z.bl. 74, 662 (1955)

KESSLER, E., Arch. Mikrobiol., 27, 166 (1957)

KESSLER, E., Arch. Mikrobiol., 55, 346 (1967)

KESSLER, E., CZYGAN, F.C., Arch. Mikrobiol., 60, 282 (1968)

KESSLER, E., CZYGAN, F.C., Arch. Mikrobiol., 54, 37 (1966)

KESSLER, E., CZYGAN, F.C., Arch. Mikrobiol., 70, 211 (1970)

KESSLER, E., LANGNER, W., LUDEWIG, I., WIECHMANN, H., Microalgae & Photosynth. Bact., 7 (1963)

KUMAR, V.M., Dissertation, Erlangen (1974)

LEGGETT BAILEY, J., Techniques in Protein Chemistry, S. 340, Elsevier, Amsterdam (1967)

LIPS, S.H., AVISSAR, Y., Eur. J. Biochem., 29, 20 (1972)

LÜCK, H., Katalase, in: Meth. of enzym. analysis, H.U. Bergmeyer ed.S. 885 - 894; New York, Acad. Press (1965)

MACHOLD, O., Biochim. Biophys. Acta, 238, 324 (1971)

MARSH, H.V., EVANS, H.J., MATRONE, G., Plant Physiol. 38, (1963)

MASSEY, V., GHISLA, S., Ann. New York Acad. Sc. 227, 446 (1974)

MAURER, H.R., Disk-Elektrophorese, De Gruyter, Berlin (1968)

MAYHEW, S.G., MASSEY, V., J. Biol. Chem. 244, 794 (1969)

MAYHEW, S.G., MASSEY, V., Biochim. Biophys., 315, 181 (1973)

MAYHEW, S.G., Biochim. Biophys. Acta 235, 276 (1971)

McKINNEY, G., J. Biol. Chem., 140, 315 (1941)

MOLINA, J.A.E., ALEXANDER, M., Antonie van Leeuvenhoek 38, 505 (1972)

NELSON, E.B., TOLBERT, N.E., Arch. Biochem. Biophys. 141, 102 (1970)

O'BRIEN, W.J., Science, 178, 616 (1972)

ÖQUIST, G., Physiolog. Plant., 25, 188 (1971)

ÖQUIST, G., Physiolog. Plant., 31, 55 (1973)

OESTERHELD, H., Dissertation, Erlangen (1970)

PANEQUE, A., RAMIREZ, J.M., DEL CAMPO, F.F., LOSADA, M., J. Biol. Chem., 239, N. 6, 1737 (1964)

PIRSON, A., Z. Bot. 31, 193 (1937)

PIRSON, A., Ann. Rev. Plant Physiol. 6, 71 (1955)

PIRSON, A., KELLNER, K., Ber. Deutsch. Bot. Ges. 65, 276 (1952)

PIRSON, A., TICHY, C., WILHELMI, G., Planta 40, 199 (1952)

PRICE, C.A., Ann. Rev. Plant Physiol. 19, 239 (1968)

RAPS, S., Biochim. Biophys. Acta, 305, 384 (1973)

RICHARDSON, M., Sci. Progr. Oxf., 61, 41 (1974)

ROTH-BEJERANO, N., LIPS, S.H., Isr. J. Bot., 22, 1 (1973)

SAGER, R., GRANICK, S., J. Gen. Physiol., 37, 729 (1954)

SAN PIETRO, A., im S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Meth. in Enzym., 6 S. 499, Ac. Press New York, (1963)

SASAKI, K., TAKAYA, K., UENO, T., Plant & Cell Physiol. 13, 601 (1972)

SCHNARRENBERGER, C., OESER, A., TOLBERT, N.E., Plant Physiol., 48, 566 (1971)

SCHOLL, R.L., HARPER, J.E., HAGEMAN, R.H., Plant Physiol., 53, 825 (1974)

SENA, E.P., RADIN, D.N., FOGEL, S., Proc. Nat. Acad. Sci.USA, 70, N. 5, 1373 (1973)

SIERSMA, P.W., CHIANG, K.S., J. Mol. Biol., 58, 167 (1971)

SOEDER, C.J., SCHULZE, G., THIELE, D., Arch. Hydrobiol. Suppl. XXXIII, 127 (1967)

SILVERBERG, B.A., SAWA, T., Protoplasma, 81, 177 (1974)

SMILLIE, R.M., ENTSCH, B., in Meth. in Enzym., 23, 504, Academic Press, New York (1971)

SNELL, F.P., SNELL, C.T., Colorimetric Methods of Anal. Van Nostrand Comp., S. 804, New York (1949)

SPILLER, H., Zulassungsarbeit, Erlangen, (1972)

SPOEHR, H.A., MILNER, H.W., Plant Physiol. 24, 120 (1949)

STABENAU, H., Planta, 118, 35 (1974)

STEPHAN, U.W., MACHOLD, O., Z.schr. Pflanzenphys. 61, 98 (1969)

SYRETT, P.J., HIPKIN, C.R., Planta, 111, 57 (1973)

TOLBERT, N.E., Ann Rev. Plant Physiol., 22, 45 (1971)

TOLBERT, N.E., in Meth. of Enzym., XXIII A, S. 665 (1971)

TOLBERT, N.E., OESER, A., YAMAZAKI, R.K., HAGEMAN, R.H., KISAKI, T., Plant Physiol., 44, 135 (1969)

TRAINOR, F.R., BURG, C.A., Science, 148, 1894 (1965)

VENNESLAND, B., JETSCHMANN, C., Biochim. Biophys. Acta, 227, 554 (1971)

W., H., Nat.Rd.schau, 3, 225 (1950)

WARBURG, O., NEGELEIN, E., Chem. Zentr., 100, 66 (1920)

WHATLEY, F.R., ORDIN, L., ARNON, D.I., Plant. Phys. 26, 414 (1951)

WHATLEY, F.R., ARNON, D.I., in S.P. Colowick and N.O. Kaplan, Meth. in Enzym., 6, S. 308, Ac.Press New York (1963)

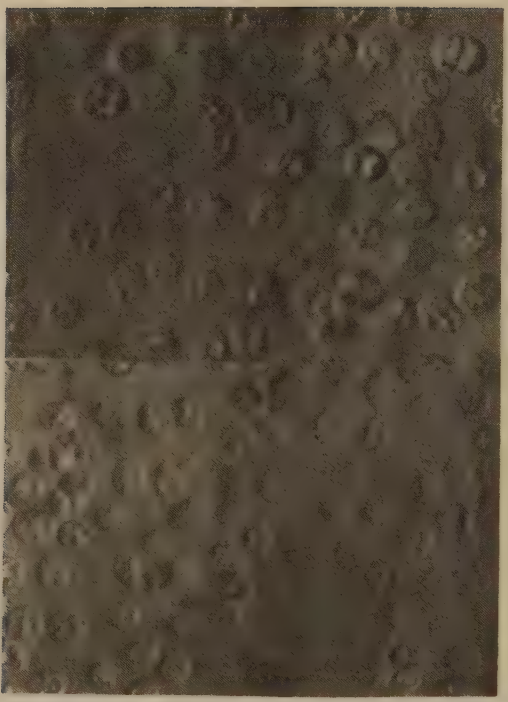
WHITE, J.E., BRODY, M., FEBS Letters, 40, N. 2, 325 (1974)

YOCH, D.C., VALENTINE, R.C., Ann. Rev. Microbiol. 26, 139 (1972)

ZUMFT, W.G., Dissertation, Erlangen, (1970)

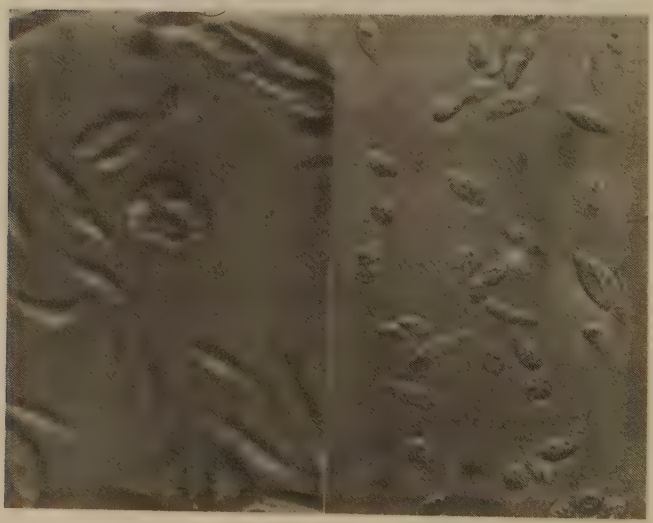
ZUMFT, W.G., SPILLER, H., Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, N. 1, 112 (1971)

1)



2)

3)

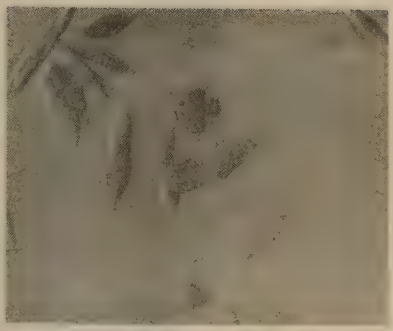


4)

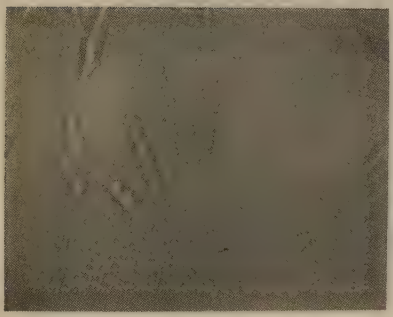
Tafel 1 Fe-Mangel: Chlorella fusca, 25 Tage (Nr. 1, 2)
Ankistrodesmus braunii, 8 Tage (Nr. 3);
25 Tage (Nr. 4)

1)

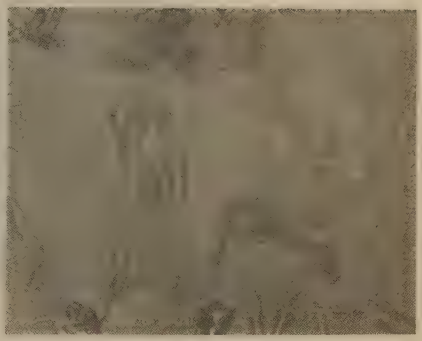
2)



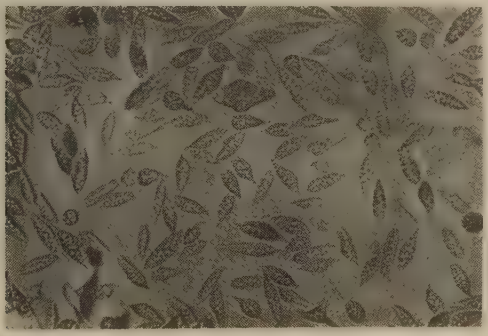
3).



4)

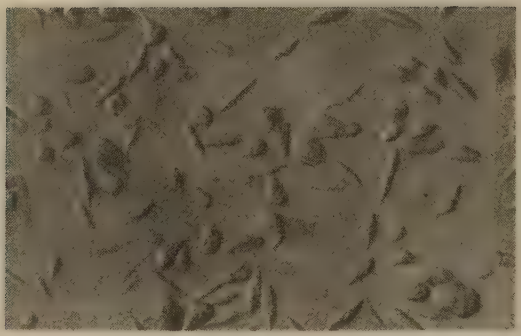


5)

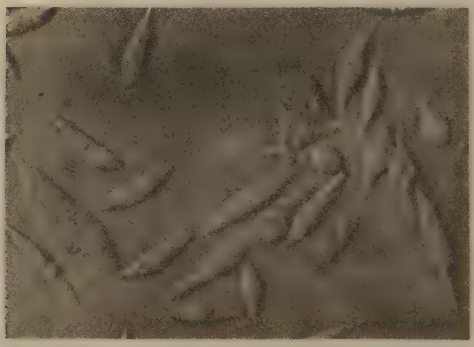


Tafel 2 Ankistrodesmus braunii Sexualstadien in N/10

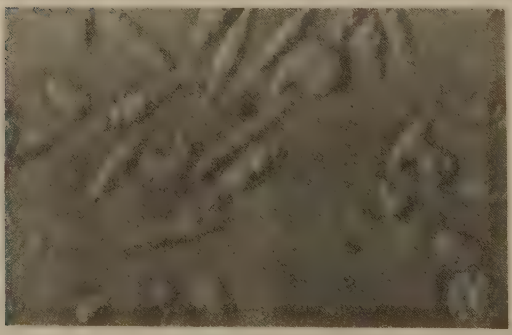
1)



2)

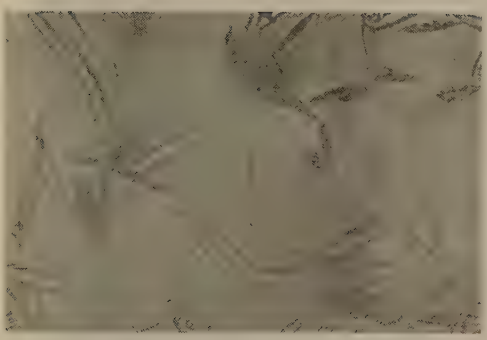


3).

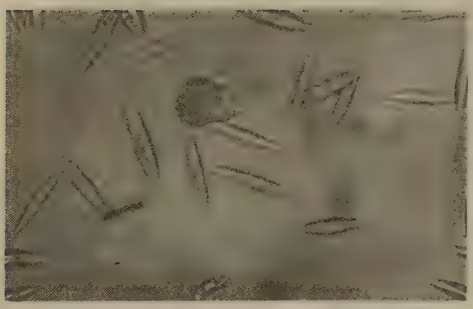


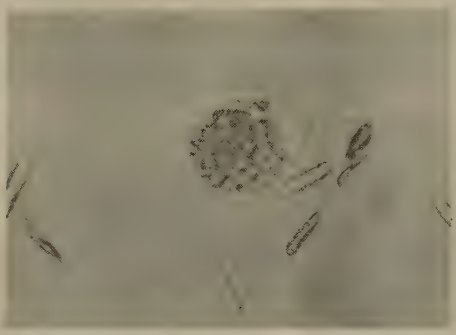
Tafel 3 Ankistrodesmus braunii: N/10, Dunkel/Glucose, 25 Tage

1)

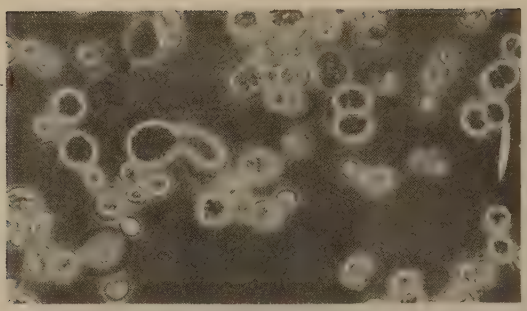


2)

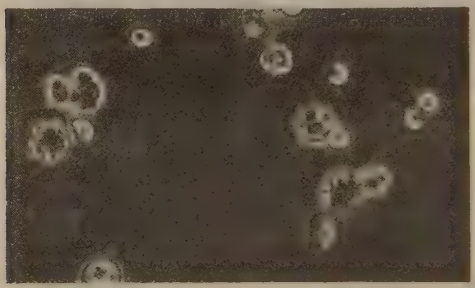




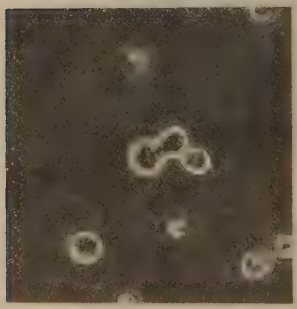
Tafel 4 Anktistrodesmus braunii, kurzfristiger CO_2-Mangel



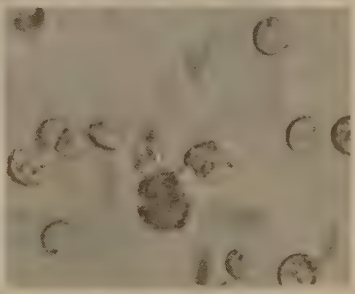
1)



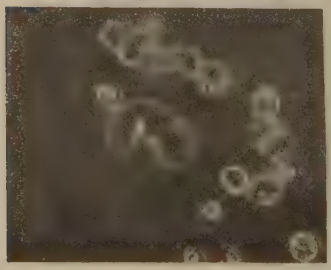
2)



3)



4)

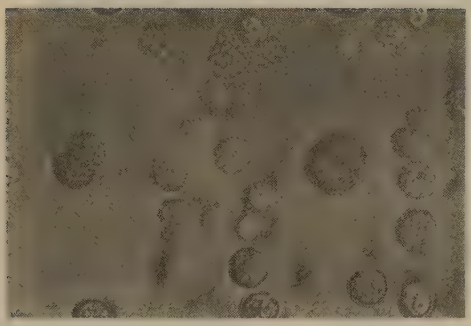


5)

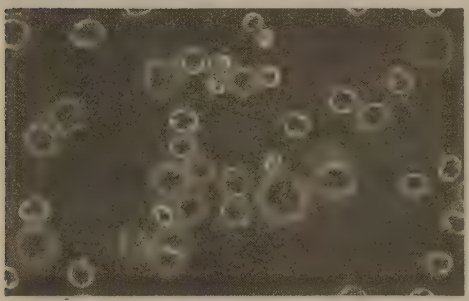
6)

Tafel 5 Chlorella fusca, Sexualstadien in N-Mangel

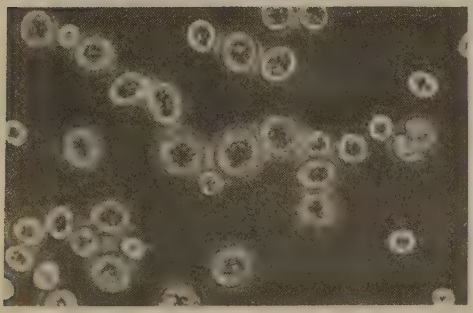
1)



2)

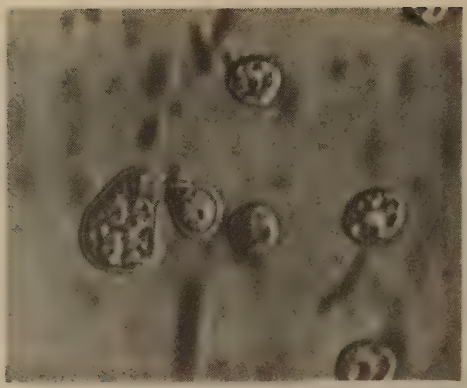


3)

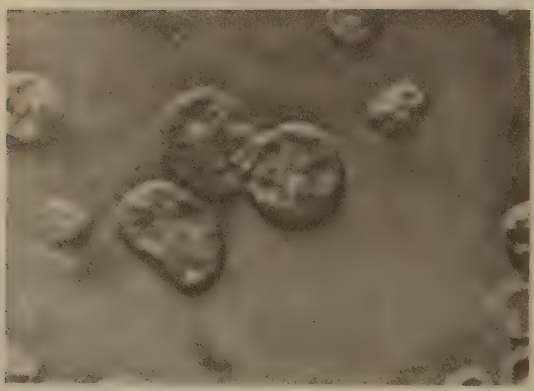


Tafel 6 Chlorella fusca, Zellstadien in N-Mangel

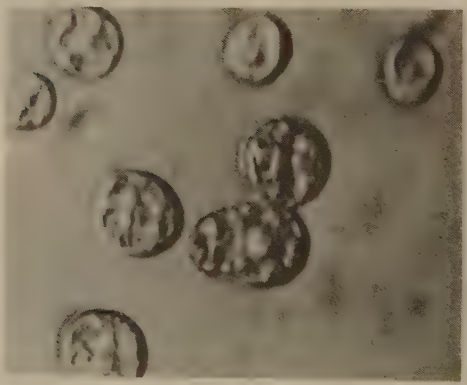
1)



2)

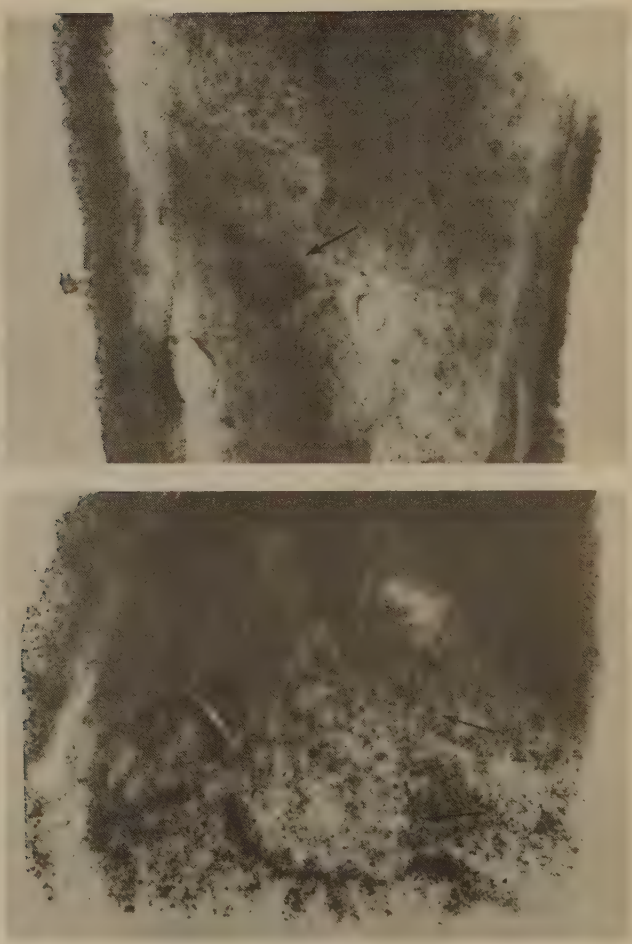


3)



Tafel 7 *Chlorella fusca*, Zellstadien in N-Mangel

Tafel 8 Querschnitt durch eine Zelle von Ankistrodesmus braunii mit Microbody (Mb). Chloroplast (Ch); Kern (K); Mitochondrium (Mi). Vergrößerung 65.000 ×



Tafel 9 Microbody von Ankistrodesmus braunii

a) Kontrastiert mit DAB, 55.000 x vergrößert.

b) Ohne DAB, singuläre Membran an Schwermetallablagerung erkennbar, 55.000 x vergrößert.

——————→ Microbody

Herrn Prof. Dr. E. Kessler danke ich für die Anregung zum Komplex der Arbeiten, für wertvolle Hinweise und stete Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. H. Korn und Herrn Dr. H. Rühl am Zoologischen Institut Erlangen danke ich für stete Unterstützung und Einarbeitung am Elektronenmikroskop.

Herrn Dr. V. Hellmann und Frl. Dipl.-Biol. S. Eisenmeier gilt mein besonderer Dank für stete Diskussionsbereitschaft und exzellente Kooperation.

Für fachmännische Hinweise zu Mikroskopier- und Photoarbeiten bin ich den Herren Dr. D. Gerlach, Dr. M. Kraml und G. Münich (Botan. Inst. Erlangen) zu Dank verpflichtet.

Für stete Unterstützung bei technischen Arbeiten gilt mein Dank Herrn G. Petsch, für ausgezeichnete technische Assistenz Frau R. Hellmann, Frl. U. Mann und Frl. U. Dressel.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die Unterstützung der Arbeiten mit Sachmitteln gedankt.

L E B E N S L A U F

Hartmut SPILLER

1. 12. 1939	in Berlin-Zehlendorf als 3. Kind des Ingenieurs Helmut Spiller und seiner Ehefrau Erika, geb. Hurt, geboren
1945 - 1950	Besuch der Grundschule in Heldra/Krs. Eschwege (Hessen)
1950 - 1959	Besuch des Neuspr. math. nat. Gymnasiums in Wanne-Eickel (Kl. 1/2) und der Wölckern-Oberrealschule in Nürnberg (Kl. 2 - 9);
1959	Abitur in Nürnberg
1959 - 1962	Studium der Pädagogik an der Päd. Hochschule Nürnberg, 1. Prüfung für das LA an Volksschulen 1962
Sept. 1962 - Febr. 1963	Unterricht an verschiedenen Volksschulen Mittelfrankens
März 1963 - Jan. 1967	Lehrer in der Entwicklungshilfe der Ev. Kirche, Dienst im Hochland von Papua/Neuguinea: Unterricht, Schulaufbau und -organisation
WS 67/68 - SS 72	Studium von Biologie/Chemie/Englisch an der Universität Erlangen-Nürnberg
1972	1. Prüfung für das LA an Gymnasien in Biologie/Chemie
Jan. 1972 - März 1973	Vertretung der Stelle eines wiss. Assistenten am Botan. Institut Erlangen
seit April 1973	Stipendiat im Sinne des Graduiertenförderungsgesetzes am gleichen Institut

DISSERTATIONSDRUCK Schadel & Wehle
86 Bamberg · Hohe-Kreuz-Str. 9b · Telefon: 0951/21617